Experimentelle Untersuchungen über die unspezifische Abwehr der Leber gegenüber unterschiedlichen Virusarten mit Hilfe der isoliert perfundierten Rattenleber

Brigitte Ertl

Diss. München
1984

[illegible]

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41534920_0032

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie,
Infektions- und Seuchenmedizin der
Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. DDr. h.c. A. Mayr

EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE UNSPEZIFISCHE ABWEHR DER LEBER GEGENÜBER UNTERSCHIEDLICHEN VIRUSARTEN MIT HILFE DER ISOLIERT PERFUNDIERTEN RATTENLEBER

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde der
Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

von
Brigitte Ertl
aus
Nürnberg

München 1983

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen
Fakultät der Universität München

Dekan: Prof. Dr. W. Leidl
Referent: Prof. Dr. Dr.h.c.mult. A. Mayr
Korreferent: Prof. Dr. M. Ruf

Tag der Promotion: 24. Februar 1984

DISSERTATIONS - UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2809090

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	Einleitung	1
2.	Schrifttum	3
2.1.	Unspezifische Abwehrmechanismen gegenüber Viren unter besonderer Berücksichtigung des Mononukleären Phagozyten Systems	3
2.1.1.	Phagozytose	3
2.1.1.1.	Definition, Funktion	3
2.1.1.2.	Bedeutung der Phagozytose für die Virusabwehr	8
2.1.2.	Spontane zellvermittelte Zytotoxizität	11
2.1.2.1.	Definition, Funktion	11
2.1.2.2.	Antivirale Wirksamkeit der SCMC	12
2.1.3.	Interferone	13
2.1.3.1.	Definition, Funktion	13
2.1.3.2.	Antiviraler Effekt von Interferon	16
2.1.4.	Unspezifische Serumfaktoren	19
2.1.4.1.	Definition, Funktion	19
2.1.4.2.	Bedeutung von Serumfaktoren bei Virusinfektionen	24
2.2.	Grundlagen der Organperfusion	26
2.2.1.	Allgemeines, Begriffsbestimmung	26

		Seite
2.2.2.	Perfusionsarten, Perfusionssysteme	26
2.2.3.	Perfusionsmedium	29
2.2.4.	Oxygenierung des Perfusionsmediums	30
2.3.	Perfusion als Untersuchungsmethode der Leber	30
2.4.	Wichtige Anwendungsgebiete der Leberperfusion	31
2.4.1.	Anwendung der Leberperfusion in der Physiologie und Biochemie	31
2.4.2.	Anwendung der Leberperfusion in der Pharmakologie	33
2.4.3.	Anwendung der Leberperfusion in Spezialgebieten der Chirurgie	33
2.5.	Anwendung der Leberperfusion in der Infektionsmedizin	34
2.5.1	Allgemeines	34
2.5.2.	Leberperfusion zur Untersuchung von Clearance und Phagozytose	35
2.5.2.1.	Definition der Begriffe Clearance und Phagozytose	35
2.5.2.2.	Untersuchungen mit inerten Partikeln und korpuskulären Elementen	36
2.5.2.3.	Untersuchungen mit Bakterien	37
2.5.2.4.	Untersuchungen mit Pilzzellen	40

		Seite
3.	Eigene Untersuchungen	42
3.1.	Grundlagen der Versuchsplanung	42
3.2.	Material und Methoden	44
3.2.1.	Versuchstiere	44
3.2.2.	Virusmaterial	44
3.2.3.	Leberperfusion	46
3.2.3.1.	Perfusionssystem	46
3.2.3.2.	Perfusion	48
3.2.4.	Quantitativer Virusnachweis in den Versuchsproben	51
3.2.5.	Bestimmung der Clearance	52
3.2.5.1.	Clearancewert bei Virusperfusionen	52
3.2.5.2.	Ermittlung der Clearancekinetik	53
3.2.6.	Bestimmung der Virusinaktivierung durch die Leber	53
3.2.7.	Immunofluoreszenz	55
3.2.8.	Elektronenoptische Untersuchungen an Lebergewebsproben	55
3.2.9.	Behandlung der Versuchstiere zur Überprüfung einer Stimulierbarkeit der unspezifischen hepatischen Abwehr	56

Seite

3.2.9.1. Verwendete Präparate 56
3.2.9.2. Behandlungsmodus und Einteilung der Versuchstiergruppen 57

3.3. Ergebnisse 58

3.3.1. Ergebnisse der Untersuchungen zur unspezifischen Abwehrfunktion der isoliert perfundierten Leber konventionell gehaltener Ratten gegenüber verschiedenen Virusarten 58
3.3.1.1. Clearancewerte 58
3.3.1.2. Zeitlicher Verlauf der hepatischen Clearance 60
3.3.1.3. Inaktivierungswerte 66
3.3.1.4. Immunofluoreszenz 68
3.3.1.5. Elektronenoptische Untersuchung der Leber nach Perfusion mit HP-1-Virus 69

3.3.2. Ergebnisse der Versuche zur Stimulierbarkeit der unspezifischen Virusabwehr der Leber keimfrei aufgezogener Ratten 72
3.3.2.1. Clearancewerte 72
3.3.2.2. Inaktivierungswerte 75

4. Besprechung der Ergebnisse 77

5. Zusammenfassung 85
Summary 87

6. Anhang 89

7. Literaturverzeichnis 99

1. Einleitung

Zur detaillierten Untersuchung der vielfältigen Funktionen des Organs Leber findet das Versuchsmodell der Leberperfusion in den Forschungsdisziplinen der Physiologie und Biochemie, der Pharmakologie und der experimentellen Chirurgie breite Anwendung.
Auch auf dem Gebiet der Infektionsmedizin wird in der letzten Zeit die Methode der Leberperfusion verstärkt eingesetzt. Da die Leber bei den Säugern das Körperorgan mit den meisten Gewebemakrophagen (Kupffersche Sternzellen) ist, kommt ihr möglicherweise eine maßgebliche Bedeutung bei der zellvermittelten Abwehr von Mikroorganismen zu. Es werden daher intensive infektiologische Forschungen angestrebt, um die Rolle der Leber bei der Abwehr von Mikroorganismen zu überprüfen. Als Versuchsmodell bedient man sich dabei vor allem der Leberperfusion. Bislang wurden derartige Untersuchungen zur Klärung der hepatischen Abwehrfunktion gegenüber verschiedenen Bakterienspezies und Pilzzellen verwendet. Dabei konnte eine deutliche Clearance- und Phagozytosekapazität der perfundierten Leber gegenüber diesen Mikroorganismen nachgewiesen werden.

Aufgabe der vorliegenden Arbeit ist es, mit Hilfe der Methode der isoliert perfundierten Rattenleber die Rolle dieses Organs bei der unspezifischen Abwehr gegenüber Virusinfektionen zu untersuchen. Im Vordergrund stehen dabei die zellgebundenen Interaktionen zwischen den Zellen der Lebersinusoide und den Viruspartikeln. Hierzu wird die Virusclearance der perfundierten Rattenleber ermittelt und der Anteil der während der Perfusion von der Leber inaktivierten Viren erfaßt. Dabei interessiert die Frage, ob die Clearance- und Inaktivierungsfähigkeit der Leber konventionell gehaltener Ratten gegenüber den unterschiedlichen Virusspezies (nackte Viren, behüllte Viren, komplex aufgebaute Viren) differiert.

Durch elektronenmikroskopische Untersuchungen ist abzuklären, inwiefern Phagozytosevorgänge durch die Lebermakrophagen für die Virusinaktivierung verantwortlich sind. Schließlich soll untersucht werden, ob durch die Vorbehandlung keimfrei aufgezogener Ratten mit verschiedenen Präparaten, welche die körpereigene Abwehr paraspezifisch steigern, eine Stimulierung der unspezifischen zellvermittelten Abwehr der Leber gegenüber Virus erreicht werden kann.

2. Schrifttum

2.1. Unspezifische Abwehrmechanismen gegenüber Viren unter besonderer Berücksichtigung des Mononukleären Phagozyten Systems

Eine wirksame Abwehr von Virusinfektionen im Säugerorganismus hängt vom Vorhandensein zahlreicher Schutzmechanismen zellulärer und humoraler Art, von deren Zusammenwirken und von ihrem Funktionszustand ab. Dabei unterscheidet man spezifische und unspezifische Abwehrvorgänge.
Wie bei den spezifischen (Immunität) sind auch bei den unspezifischen Abwehrmechanismen gegenüber Virusinfektionen zelluläre und humorale Komponenten beteiligt. Als zellvermittelte, nichtantigenspezifische Abwehrmechanismen sind bisher die Phagozytose und die spontane zellvermittelte Zytotoxizität bekannt. Von den unspezifischen humoralen Faktoren besitzen die Interferone und Serumfaktoren, wie z.B. Komplement, Lysozym und Properdin, die größte Bedeutung.

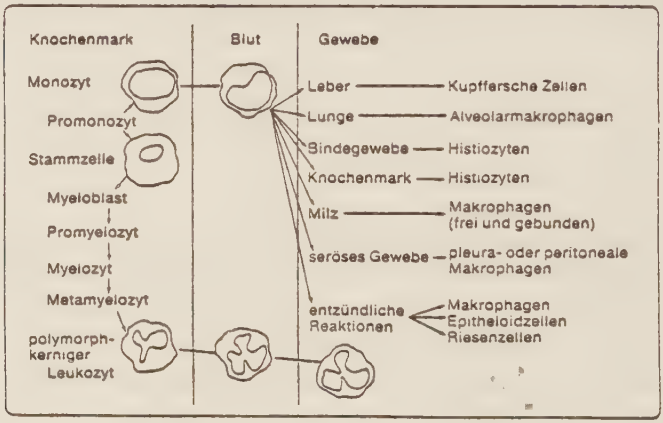
2.1.1. Phagozytose

2.1.1.1. Definition, Funktion

Eines der Kennzeichen für die Lebensfähigkeit von Zellen ist der energieverbrauchende Stoffaustausch. Die aktive Aufnahme von Material in das Zellplasma wird als Endozytose bezeichnet. Dabei unterscheidet man zwischen Pinozytose als dem Einverleiben von Flüssigkeiten und der Phagozytose als Aufnahme von Mikroteilchen.
Der Begriff der Phagozytose wird allerdings bei der Abwehr von Fremdpartikeln durch bestimmte Körperzellen enger gefaßt: Unter Phagozytose versteht man die Aufnahme und Vernichtung von fremden, inerten Partikeln und Mikroorganismen durch so-

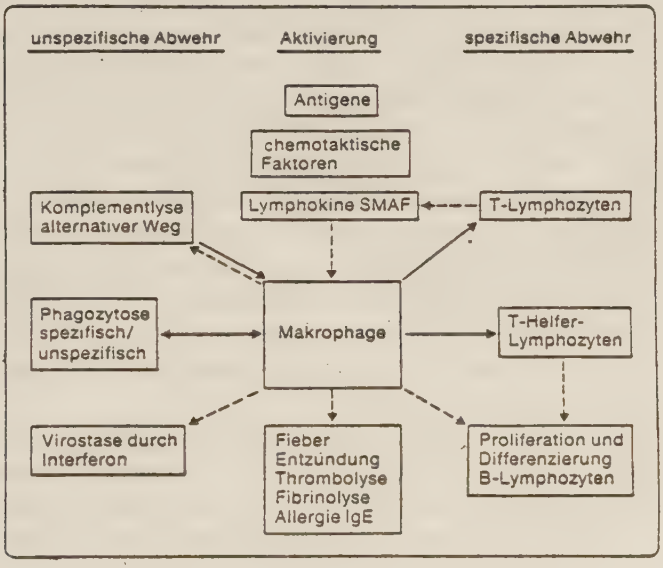
genannte Phagozyten (80). Dazu zählen die Mikrophagen (polymorphkernige Granulozyten), auf die im folgenden nicht eingegangen wird, und die Makrophagen, die das System der mononukleären Phagozyten (101) bilden.
Mononukleäre Phagozyten leiten sich von gemeinsamen Stammzellen des Knochenmarks ab, aus denen sich über die Vorläuferzellen Monoblast und Promonozyt die Blutmonozyten und daraus wiederum die im Gewebe fixierten oder freien Makrophagen entwickeln. Zu den Gewebemakrophagen sind die Histiozyten des Bindegewebes und des Knochenmarks, die freien oder fixierten Makrophagen der serösen Körperhöhlen, der Lymphknoten und der Milz, die Kupffer'schen Sternzellen der Leber, die Alveolarmakrophagen der Lunge, die Mikroglia des ZNS und eventuell die Osteoklasten des Knochengewebes zu rechnen (Abb. 1).

Abb. 1: Entwicklung von Monozyten, Makrophagen und polymorphkernigen Leukozyten (nach Uhlenbruck (99))



Die Zellen des Mononukleären Phagozyten Systems (MPS) sind durch einen hohen Grad an Phagozytosefähigkeit gekennzeichnet. Im Gesamtsystem der Körperabwehr kommt ihnen eine bedeutende, wenn nicht zentrale Funktion zu (56, 57) (Abb. 2). Dies kann dadurch belegt werden, daß die Makrophagen an ihrer Oberflächenmembran bestimmte Rezeptoren besitzen, wie z.B. Fc-Rezeptoren für IgG und monomeres IgM, C3-Rezeptoren für die dritte Komponente des Komplementsystems, desweiteren Rezeptoren für Lymphokine (z.B. MIF, MAF) und solche für T- und B-Lymphozyten (58).

Abb. 2: Die Position der Makrophagen innerhalb spezifischer und unspezifischer Abwehrvorgänge (nach Uhlenbruck (99))



Neben der Fähigkeit zur Phagozytose besitzen die Makrophagen weitere Eigenschaften, die ihre Bedeutung bei der Abwehr von körperfremdem Material unterstreichen (58, 99). Durch das "Antigen-Processing" und die "Antigen-Präsentation" pha-

gozytierter Antigene tragen sie zur Antigenvermittlung an T- und B-Lymphozyten und damit zur Immunitätsbildung bei (3 , 58 ,64) . Sie regulieren die Funktion der Lymphozyten durch Abgabe von Interferon, Interleukinen vom Typ I und Prostaglandinen (3 , 58 ,96). Andererseits sind sie fähig, bestimmte Stoffe zu synthetisieren und zu sezernieren, wie z.B. Pyrogene, Interferon, Komplementproteine und Lysozym. Makrophagen vermögen ferner den "alternate pathway" der Komplementaktivierung in Gang zu bringen und setzen für Entzündungsvorgänge typische Substanzen frei, z.B. Prostaglandine, SRS-A, Plasminogenaktivator und Kollagenase (3 , 58 ,99).

Dennoch ist die biologische Bedeutung der mononukleären Phagozyten primär durch ihre Phagozytosetätigkeit geprägt (3) . Die Phagozytose stellt den phylogenetisch ältesten und wichtigsten nichterreger- und nichtantigenspezifischen Abwehrmechanismus im zellulären System dar. Diese Fähigkeit zur unspezifischen Abwehr besitzt nicht nur der ruhende Makrophage, sondern auch der durch Antigenkontakt aktivierte Makrophage, der in all den makrophagentypischen Eigenschaften antigenvermittelt, jedoch unspezifisch stimuliert ist (49).

Der Vorgang der Phagozytose durch Makrophagen (97) läßt sich in vier Phasen unterteilen (vgl. Abb. 3):

1.) Chemotaxis: In dieser Phase bewegen sich die Makrophagen aktiv auf die zu phagozytierenden Partikel zu. Sie ist bei Makrophagen nicht so stark ausgeprägt wie bei Mikrophagen.

2.) Adsorption des Fremdmaterials an die Zellmembran der Makrophagen: Dabei scheinen die Oberflächeneigenschaften wie Oberflächenladung und hydrophobe Membraneigenschaften von entscheidender Bedeutung zu sein. Für den Vorgang nicht notwendig, aber fördernd auf die Erkennung und Anhaftung der Partikel durch Makrophagen wirken sowohl unspezifische humorale Faktoren, wie z.B. Komplement, als auch die spezifische Immunglobulinbeladung der Partikel.

3.) Ingestion: Unter dem Begriff Ingestion versteht man die Aufnahme des Fremdmaterials in das Zytoplasma. Mittels Pseudopodien oder anderer Zytoplasmaprotrusionen (z.B.

Abb. 3: Schematische Darstellung der wichtigsten Phasen des Phagozytose-Vorgangs

Lamellipodien) werden die Partikel umflossen, invaginiert und in einem Phagosom separiert. Die hierfür notwendige Energie wird durch Glykolyse und Glykogenolyse bereitgestellt.

4.) Digestion: Durch Verschmelzen des Phagosoms mit primären und sekundären Lysosomen, in denen katabole Enzyme, Lysozym und Katalase gespeichert sind, entstehen Phagolysosomen (Degranulation). In diesen Strukturen wird das Fremdpartikel durch Einwirken des sauren pHs, der Enzyme und von H_2O_2, ·OH-Radikalen und Halogenionen inaktiviert und abgebaut. Das abgebaute Material kann entweder in Telolysomen intrazellulär gespeichert, durch Exozytose aus dem Zytoplasma entfernt oder dem Zellstoffwechsel zugeführt werden.

2.1.1.2. Bedeutung der Phagozytose für die unspezifische Virusabwehr

Das MPS ist aufgrund seiner Fähigkeit zur erreger- und antigenunspezifischen Phagozytose von Fremdpartikeln ein wichtiger zellulärer Faktor bei der nichtspezifischen Abwehr von Virusinfektionen.

Die Aufnahme und der Abbau von Viren in den Makrophagen im Verlauf von Virusinfektionen gilt als erwiesen (62, 71). Die Phagozytose intakter Viruspartikel stellt neben der Abgabe von virostatischen und viruziden Substanzen (Komplement, Interferon, lysomale Enzyme) durch die Makrophagen einen wichtigen Mechanismus zur Inhibierung einer Virusinfektion dar. In den Lysosomen der mononukleären Phagozyten sind antivirale Aktivitäten, wie das Zusammenwirken von H_2O_2 mit Katalase und Halogenionen oder die Lipidperoxidation durch das Hydroxylradikal ·OH, vorhanden. Daneben tragen H^+-Ionen und lysosomale Enzyme zu Inaktivierung und Abbau der Viruspartikel bei (64, 71).

Aktivierte Makrophagen, die diese Eigenschaft durch Aufnahme

von verdaubaren Substanzen unspezifisch erwerben können, besitzen neben einer zahlen- und leistungsmäßig gesteigerten Ingestion auch eine erhöhte unspezifische Inaktivierungskapazität gegen Viren (49, 64).

Die Makrophagen zählen zu den ersten Zellen des Abwehrsystems, die mit infizierendem Virus in Kontakt gelangen, und beeinflussen entscheidend die Pathogenese einer Virusinfektion.

Einige Virusarten besitzen die Fähigkeit, sich nach Aufnahme in die Makrophagen dem normalen Ablauf der Phagozytose zu entziehen. Anstatt abgebaut zu werden, vermehren sie sich in den Zellen des MPS oder benützen diese als Transportmittel, um zu affinen Geweben oder Organen zu gelangen. Dieses Phänomen tritt bei gewissen viralen Infektionskrankheiten, wie z.B. der Staupe des Hundes, feliner infektiöser Peritonitis, infektiöser Anaemie der Einhufer, der Aujeszky'schen Krankheit der Schweine und der Ektromelie der Maus auf (80).
Andererseits kommt den Makrophagen eine Schlüsselfunktion bei der nichtspezifischen Abwehr in den ersten Tagen einer Virusinfektion zu, was durch Infektionsversuche unter Ausschaltung der Makrophagen mit dem spezifischen Makrophagentoxin Silica bewiesen werden konnte (64, 71, 98).
Wie Experimente mit der Coronavirus-bedingten Hepatitis der Maus (98) belegen, schützte eine intranasale Inokulation mit schwachvirulentem Mäusehepatitisvirus (MHV-S) empfängliche Mäuse schon kurze Zeit später gegenüber einer sonst tödlichen Infektion mit hochvirulentem Mäusehepatitisvirus (MHV-2). Dieser unspezifische antivirale Schutz beruhte weder auf einer Virusinterferenz, Interferonwirkung oder Antikörperreaktion. Er ließ sich ebensowenig auf einen B- oder T-Zelleffekt zurückführen, sondern wurde von Peritonealmakrophagen vermittelt.
Die Bedeutung der Makrophagen für den Verlauf einer viralen Infektion unterstreicht auch die altersabhängige Empfänglichkeit gegenüber der Generalisierung von Virusinfektionen. Infolge der Unreife der Makrophagen bei Baby-Mäusen führte z.B. eine Herpes-Simplex-1-Infektion zur lethalen Enzephalitis, eine Herpes-Simplex-2-Infektion zur tödlichen Hepatitis. Der

unspezifische Schutz der Adultmäuse gegenüber der entsprechenden Allgemeininfektion manifestierte sich an den Zellen des MPS, die deutlich weniger und überwiegend defekte Viruspartikel vermehrten und mehr viruzide Substanzen bildeten (64).

Die Resistenz von Labortierstämmen gegenüber bestimmten Virusinfektionen ist ebenfalls auf die antivirale Aktivität der Makrophagen zurückzuführen. Bei einzelnen Mäusezuchtlinien besteht eine genetisch verankerte Unempfänglichkeit gegenüber Arboviren der Gruppe B, Mäuse-Hepatitisvirus und Influenzavirus; ferner ist auch eine virusstamm- und virustypbezogene Resistenz verschiedener Mäusestämme festzustellen (Ektromelie, Herpes-Simplex-Hepatitis). Diese genetisch bedingten Unempfänglichkeiten wurden als makrophagenvermittelt nachgewiesen (64, 71).

Desweiteren besitzen die Makrophagen bei der unspezifischen Virusabwehr eine Effektorfunktion, die nicht auf der direkten Auseinandersetzung der Phagozyten mit den Viren, sondern auf der Eliminierung virusinfizierter Zellen beruht. Untersuchungen über die verschiedenen Zytolyseformen bei der Zerstörung virusinfizierter Zellen ließen bei der Semliki-Forest-Virus-Infektion (mäusepathogenes Togavirus) ein abgestuftes Einsetzen zytotoxischer Aktivitäten mit zunehmender Spezifität erkennen. Ab dem 1. Tag nach der Infizierung entwickelte sich eine unspezifische Zytotoxizität, die ihre höchste Aktivität am 2. und 3. Tag besaß und nach einer Woche nicht mehr nachzuweisen war. Ab dem 3. Tag p.i. traten spezifisch geprägte T-Lymphozyten auf. Ab dem 4. Tag p.i. erschienen zytotoxische Antikörper, die längere Zeit persistierten (Einsetzen der Immunität). In den ersten Tagen der Infektion fungierten die Makrophagen als nichtspezifische Effektorzellen wobei die Eliminierung virusinfizierter Zellen durch direkte Zytolyse oder durch Phagozytose erfolgte (79).

2.1.2. Spontane zellvermittelte Zytotoxizität

2.1.2.1. Definition, Funktion

Die spontane zellvermittelte Zytotoxizität (SCMC) ist als antiviral wirkender Faktor erst in den letzten Jahren entdeckt worden. Entsprechend ist man sich über ihre Wirkungsmechanismen noch nicht ganz im Klaren. Die SCMC soll Zellen, die als körperfremd erkannt werden, lysieren, ohne hierzu antigenspezifisch stimuliert zu werden. So stellt die SCMC eine wichtige Komponente bei der Beseitigung von tumorös entarteten bzw. virusinfizierten Zellen dar und trägt zur Aufrechterhaltung der Integrität des Individuums bei.

Über die zellulären Grundlagen der SCMC liegen noch keine endgültigen Erkenntnisse vor. Die für die SCMC verantwortlichen Zellen befinden sich vornehmlich im Blut, in der Milz und in den Lymphknoten. Sie können weder als Granulozyten, Makrophagen oder Monozyten noch als antigenspezifizierte T- oder B-Lymphozyten charakterisiert werden (54, 71). Als Träger der SCMC werden sog. Null-Lymphozyten (O-Zellen) diskutiert, die als dritte autonome Population der Lymphozyten gelten. Die Zellen, welche die SCMC vermitteln, dürfen nicht mit den antigenspezifizierten T-Killer-Zellen gleichgesetzt werden, weshalb man sie als "natural killer cells" (NK-Zellen) bezeichnet.
Ihre Differenzierung läuft thymusunabhängig ab, jedoch scheint ihre Reifung knochenmarksabhängig zu sein und von Makrophagen beeinflußt zu werden. Neuere Ergebnisse der NK-Zellforschung belegen, daß sich die NK-Zellen der Maus in zwei Untergruppen einteilen lassen; zum einen wurden knochenmarksabhängige, thymusunabhängige Lymphozyten (NK-Zellen), zum anderen knochenmarksunabhängige, spontan zytotoxische Zellen (sog. NC/NK-B-Zellen) entdeckt, die sich in der Zielzellselektivität voneinander unterscheiden. Dagegen wurden bei Ratten nur knochenmarksunabhängige, gegen lymphoide wie nichtlymphoide Zielzellen in gleicher Weise aktive natürliche Killer-Zellen nachgewiesen (108).

Die unspezifische Erkennungsfunktion ist möglicherweise mit dem Haupthistokompatibilitätskomplex assoziiert. Die unterschiedliche Empfänglichkeit von Zielzellen gegenüber der Lysis durch NK-Zellen scheint ihre Ursache darin zu haben, daß bestimmte Oberflächenproteine an den Zielzellen vorhanden sind oder fehlen (72). An der Effektor-Zielzell-Interaktion sind lösliche Produkte, wie Lymphotoxine, Interferon und proteolytische Enzyme beteiligt. Untersuchungen über die Beeinflußbarkeit der SCMC weisen darauf hin, daß sie durch Interferon und Interferon-Induktoren gesteigert werden kann.
Andererseits wurde durch eine gezielte Immunsuppression mit hohen Dosen von Hydrocortison, Cyclophosphamid oder Röntgenstrahlen die NK-vermittelte Zytotoxizität bei Ratten deutlich gehemmt. Die Aktivitätsminderung ließ sich durch Verabreichung von Poly I:C aufheben. Dieser Effekt trat allerdings nicht mehr auf, wenn die Makrophagen durch Silica-Vorbehandlung spezifisch geschädigt waren. Dies läßt einerseits auf eine Interaktion zwischen dem MPS und den NK-Zellen schließen, andererseits scheinen die Makrophagen eine Rolle bei der Poly I:C-induzierten Aktivierung der SCMC zu spielen (73).

2.1.2.2. Antivirale Wirksamkeit der SCMC

Versuche zur Abwehrfunktion eines kongenital thymuslosen Mäusestammes (athymic nude mouse) belegen, daß die NK-Zellen eine Vielzahl akut und persistierend virusinfizierter Zielzellen selektiv, aber unspezifisch lysieren können (71).

Die Interaktionen mit virusinfizierten Zellen sind komplex (102). Art und Resultat dieser Auseinandersetzung hängen von der Virusart, der verwendeten Zielzelle und dem Ausmaß der Infektion ab. So erwiesen sich z.B. mit Masern-, Mumps- oder VS-Virus persistierend infizierte Zielzellen besonders empfindlich gegen die NK-vermittelte Zytotoxizität (71).

Die NK-Zellen besitzen neben den Makrophagen entscheidende Bedeutung bei der frühzeitigen Limitierung einer Virusaus-

breitung, bevor die virusspezifischen, immunologischen Reaktionen einsetzen. Dies konnte am Beispiel der Semliki-Forest-Virusinfektion und der LCM der Maus bewiesen werden (50, 103).

Der genetisch fixierte Unterschied in der Empfänglichkeit von Küken zweier verschiedener Zuchtlinien gegenüber der Marek-Infektion korrelierte mit dem Nachweis einer NK-Aktivität, die bei der resistenten Zuchtlinie signifikant erhöht war (90).

Eine Steigerung der SCMC wurde bei verschiedenen Säugern (Maus, Schwein, Rind, Pferd, Nerz, Tiger) und beim Huhn im Verlauf von Virusinfektionen (LCM, Influenza) beobachtet (48). Dabei wird der Mechanismus einer Aktivierung der NK-Zellen durch eine Virusinfektion zum einen auf das Zusammenwirken von NK-Zellen und Interferon zurückgeführt (6, 29) ; zum anderen wird der Einbau viraler Glykoproteine in die Zellmembran, wie das für Masern-, Mumps- und LCM-Glykoproteine nachgewiesen ist, für die Stimulation der SCMC verantwortlich gemacht (20).

2.1.3. Interferone

2.1.3.1. Definition, Funktion

Interferone (IFN) sind Glykoproteine (Molekulargewicht 20 000 bis 100 000 Dalton), die auf exogene Reize von den verschiedensten Körperzellen gebildet und in die Körperflüssigkeiten abgegeben werden. Sie vermitteln nicht nur den produzierenden Zellen, sondern auch solchen, die mit freiem IFN in Kontakt gelangen, einen Zustand erhöhter Abwehr. Die natürliche Synthese der Interferone wird vor allem durch Virusinfektionen induziert, doch stimulieren auch bestimmte Bakterien-, Pilz- und Protozoeninfektionen, mikrobielle Extrakte und andere biologische Substanzen eine IFN-Produktion. IFNe wirken grundsätzlich antigenunspezifisch. Bisher galten die IFNe als speziesspezifisch, was nach neueren Erkenntnissen jedoch nicht mehr generell gültig ist (8 ,27).

Man unterscheidet zwei Gruppen von Interferonen:

a) Mikrobiell induzierte α- und β-Interferone (sog. Virusinterferone):
   α-IFN wird nach mikrobiellem, vorwiegend viralem Kontakt in Leukozyten, β-IFN in Fibroblasten produziert. Die Virusinterferone zeichnen sich durch eine hohe pH-Stabilität (12 = pH = 2) aus. Vom α-IFN sind inzwischen 16 Subtypen bekannt, während beim β-IFN offenbar keine Subtypen existieren.

b) γ-Interferon (sog. Immuninterferon):
   Es wird nach Antigen- oder Mitogenstimulus von Zellen der lymphoiden Reihe (wahrscheinlich T-Lymphoblasten) gebildet und besitzt in seiner Eigenschaft als Lymphokin eine zentrale Bedeutung bei der Immunmodulation (27, 70). Es wurden bisher keine Subtypen gefunden. Charakteristisch für γ-IFN ist die Labilität bei pH 2.

Nach dem zeitlichen Auftreten im Verlauf einer Virusinfektion werden die IFNe in sog. "Frühinterferone" (2 bis 4 h p.i.) und sog. "Spätinterferone" (12 bis 24 h nach Antigenkontakt) eingeteilt. Früh- und Spätinterferone unterscheiden sich in der Dauer ihrer Wirksamkeit (Spätinterferone werden langsamer abgebaut) und im Molekulargewicht (Früh-IFN 20 000 bis 50 000 D; Spät-IFN 80 000 bis 100 000 D). Die differierenden Molekulargewichte innerhalb der beiden IFN-Gruppen sollen durch unterschiedliche Glykosyl-Anteile bedingt sein (51) bzw. auf einer Aggregation der monomeren Proteinmoleküle beruhen (38).

Die am längsten bekannte Funktion der IFNe ist die antivirale Aktivität (Isaacs, Lindenmann, 1957), (41). Daneben schalten sie sich aber auch als Vermittler in das Gesamtsystem der Abwehr ein. Ihr Einfluß auf das Abwehrsystem ist komplex, wobei sie sowohl stimulierend wie hemmend wirken. Die Zusammenhänge sind im einzelnen noch nicht abgeklärt.

IFN stimuliert z.B. die Phagozytose durch Aktivierung der Makrophagen (27, 51, 70) und die spontane Zytotoxizität

durch Steigerung der Aktivität der NK-Zellen (27, 54). Sie besitzen einen modifizierenden Effekt auf Zellmembranen. Indem sie möglicherweise die Expression von Oberflächenantigenen bei virusinfizierten oder transformierten Zellen verstärken, fördern sie die Erkennung und die Elimination veränderter Zellen (27).
Andererseits ist eine antiproliferative Eigenschaft der IFNe nachgewiesen. Sie hemmen die Proliferation tumorös entarteter sowie durch Viren transformierter Zellen, aber auch die Transformation und Proliferation von T- und B-Lymphoblasten und in gewissem Ausmaß die normale Zellvermehrung. Die IFNe beeinflussen somit auch die B-Zellfunktion, insbesondere die Antikörperbildung und die Entstehung von Memory-Zellen, und die T-Zell-Aktivitäten, wie z.B. die verzögerte Hypersensibilität und die Transplantatabstoßung, wobei der stimulierende bzw. hemmende Effekt offensichtlich dosisabhängig ist (24).
Die immunmodulatorische Wirkung der IFNe wird neuerdings vor allem dem γ-IFN zugesprochen, kann aber auch durch α- und β-IFNe vermittelt werden (24, 27).
Der Wirkungsmechanismus dieser Regulationsfunktion der IFNe auf das Abwehrsystem manifestiert sich auf zellulärer Ebene. Nach neueren Erkenntnissen verändert die Bindung der Glykoproteine an spezielle Rezeptoren der Oberflächenmembran entsprechender Zellen den intrazellulären c-AMP-Spiegel, induziert die Bildung von Proteinkinasen und steht in Zusammenhang mit der Sekretion von Prostaglandinen, die eine negativ regulierende Funktion der Immunantwort innehaben (30, 35, 40).

Die klinische Anwendung von exogenen IFNen beim Menschen erbrachte genauere Erkenntnisse, durch welche die anfängliche Euphorie gegenüber den IFNen als viruslimitierendem, antitumoralem und abwehrstimulierendem Faktor einer differenzierteren Betrachtungsweise weichen mußte.
Die lokale Anwendung exogenen IFNs wird bei viralen Infektionen des oberen Respirationstraktes sowie bei der Therapie von Herpesvirusinfektionen (Gürtelrose, Windpocken, Herpes labialis) und virusbedingten papillomatösen Erkrankungen prakti-

ziert und erprobt. Der Verlauf der chronisch progredienten Hepatitis bei der Hepatitis-B-Virusinfektion konnte ebenfalls positiv beeinflußt werden (51,106). Der Einsatz von exogenem IFN zur Tumorbekämpfung ist außerordentlich problematisch. Gewisse Tumoren scheinen in einem bestimmten Stadium in ihrem Wachstum und ihrer Neigung zu metastasieren gehemmt zu werden (Gallenblasenkarzinom, Hautkarzinome bei lokaler Anwendung, systemische Anwendung bei hämatologischen Blastosen, Osteosarkomen). Andererseits sprachen andere Tumoren nicht auf eine Therapie mit IFN an (Melanome, Bronchialkarzinome) (51 ,106). Es kann sogar zu einem Enhancement kommen.

Außerdem traten bei der Anwendung von exogenem IFN zur Virusinfekt- und Tumorbekämpfung Probleme auf, die durch die Zelltoxizität der IFNe infolge des Hemmeffekts auf die normale Zellvermehrung und die DNA-Synthese bedingt sind (40, 106). Desweiteren ergaben sich Probleme durch die Antigenität aufgrund des Proteincharakters der IFNe (100). Die Unkenntnis genauer Dosis-Wirkungs-Beziehungen birgt folglich die Gefahr der übermäßigen Steigerung der hemmenden Funktionen auf das Abwehrsystem sowie der Entstehung unerwünschter Nebeneffekte (grippeähnliche Allgemeinsymptome, Verzögerung von Regenerationsvorgängen).
Unter diesem Aspekt erscheint die Stimulierung endogenen IFNs durch sog. IFN-Inducer zumindest für den Einsatz bei Virusinfektionen mit weniger Komplikationen behaftet zu sein.

2.1.3.2. Antiviraler Effekt von Interferon

IFN gehört zu den früh einsetzenden, unspezifischen Abwehrfaktoren gegen Virusinfektionen. In der Regel erfolgt die virale Induktion von IFN in der Anfangsphase der Virus-Zell-Interaktion. IFN tritt ab 2-6 h p.i. auf, maximale Konzentrationen werden nach 12-24 h p.i. erreicht. Es dient zur Begrenzung viraler Lokalinfektionen, kann bei zyklischen Infektionskrankheiten das Stadium der Viraemie bzw. der Organ-

manifestation verhindern bzw. zur Wiedergenesung von Viruserkrankungen beitragen (71).
Dabei reagieren die IFNe nicht direkt mit den Viren, sondern fungieren wie schon bei der immunmodulierenden Wirkung als Mediatorproteine, die durch eine Rezeptor-Bindung den Status der entsprechenden Zellen derart verändern, daß in diesen keine Virusvermehrung mehr stattfindet. Der genaue Wirkungsmechanismus der humoralen Funktion der IFNe ist noch unklar, doch scheint die IFN-Rezeptor-Interaktion die Aktivierung bestimmter Enzyme (einer Proteinkinase und einer Ribonuklease) zu induzieren. Diese Zellenzyme heben die Repression des Operatorgens auf, das die Synthese eines sog. antiviralen Proteins (AVP) durch Transkription eines bestimmten Chromosomenabschnitts (Gen des antiviralen Proteins) in Gang setzt. Dieses antivirale Protein wird auch als "translation inhibitory protein"(TIP) bezeichnet, da die Hemmung der viralen Proteinsynthese wahrscheinlich auf der Ebene der Translation der Virusinformation an den Ribosomen abläuft (27, 51, 54, 71) . Durch das humorale Wirkungsprinzip ist verständlich, daß die IFNe einen virusunspezifischen Schutz vermitteln. Der durch IFNe vermittelte antivirale Schutz ist nicht generell speziesspezifisch, wie der Nachweis der Übertragung der Nichtempfänglichkeit gegenüber einer VSV-Infektion von einer Mäuse- auf eine humane Zellinie durch γ-IFN belegen (8).
Der genetisch fixierte Schutz gewisser Mäusestämme vor der Infektion mit Encephalomyocarditis (EMC)-Virus, VSV, NDV und Influenzaviren konnte durch Vorbehandlung mit Anti-IFN-Serum völlig aufgehoben werden, was die Bedeutung des IFNs als wichtige Komponente bei der Ausbildung einer Resistenz gegenüber Virusinfektionen unterstreicht (71).

Allerdings darf der antivirale Effekt von IFN nicht als ein Abwehrmechanismus angesehen werden, der gegen jede Virusinfektion in jedem Wirt in gleicher Weise und mit dem gleichen Resultat wirksam ist (22, 54). Zum einen gibt es bei den einzelnen Virusarten Unterschiede in der Induktionsfähigkeit

von IFN nach Infektion der Zelle, und zwar sowohl zeitlich wie auch mengenmäßig. So sind gewisse Parainfluenzaviren (NDV, Sendaivirus) und Arboviren gute IFN-Induktoren, während die Gruppe der sog. "slow viruses" und z.B. das BVD-MD-Virus keine oder nur eine unwesentliche IFN-Induktion bewirken. Allgemein beobachtet man, daß auf Infektionen mit Viren, die sich sehr schnell intrazellulär vermehren, wenig oder zu spät IFN gebildet wird; dagegen lassen Viren, die sich langsamer replizieren, der Zelle Zeit, adäquat IFN zu bilden und abzugeben (22).
Zum zweiten differiert die Empfindlichkeit einzelner Virusarten gegenüber IFN. Das Virus der Vesikulären Stomatitis (VSV) wird wegen seiner IFN-Empfindlichkeit häufig zum IFN-Nachweis im Plaquereduktionstest verwendet. Viele Arbo-, Myxo- und das Vacciniavirus erweisen sich als hochgradig sensitiv gegen IFN. Beim Adeno-, Herpes- und Newcastle-Disease-Virus ist jedoch die Empfindlichkeit weniger ausgeprägt (22).
Es ist sogar nachgewiesen, daß bestimmte Virusarten in den infizierten Zellen die Bildung von IFN-Antagonisten hervorrufen können und sich somit der IFN-Wirkung entziehen (87).

Desweiteren wird die Virusabwehr dadurch beeinflußt, daß virusinfizierte Zellen auf den viralen Stimulus hin unterschiedlich effektiv IFN produzieren. Wird schnell und viel IFN synthetisiert (optimale Proteinbiosynthese), so wirkt das IFN i.d.R. limitierend auf die Ausbreitung der Virusinfektion. Setzt die IFN-Bildung aber erst mit zeitlicher Verzögerung ein, so kann durch das IFN im Zusammenwirken mit anderen unspezifischen bzw. spezifischen Abwehrfaktoren allenfalls die Milderung des Krankheitsverlaufs und die raschere Genesung des Wirts erwartet werden. Fehlt eine entsprechende IFN-Antwort auf die Virusinfektion, so können persistierende Infektionen entstehen, z.B. Infektionen vom "slow virus disease-Typ" oder okkulte Infektionen mit onkogenen Virusarten.
Außerdem kann scheinbar die zelluläre Rezeptorempfindlich-

keit auf freies IFN variieren. So war die Resistenz gewisser Inzuchtmäusestämme gegenüber Arboviren in einer gegenüber den empfänglichen Mäusen deutlich erhöhten Reaktionsfähigkeit der Zellen auf die humorale IFN-Wirkung hin begründet (71).

2.1.4. Unspezifische Serumfaktoren

2.1.4.1. Definition, Funktion

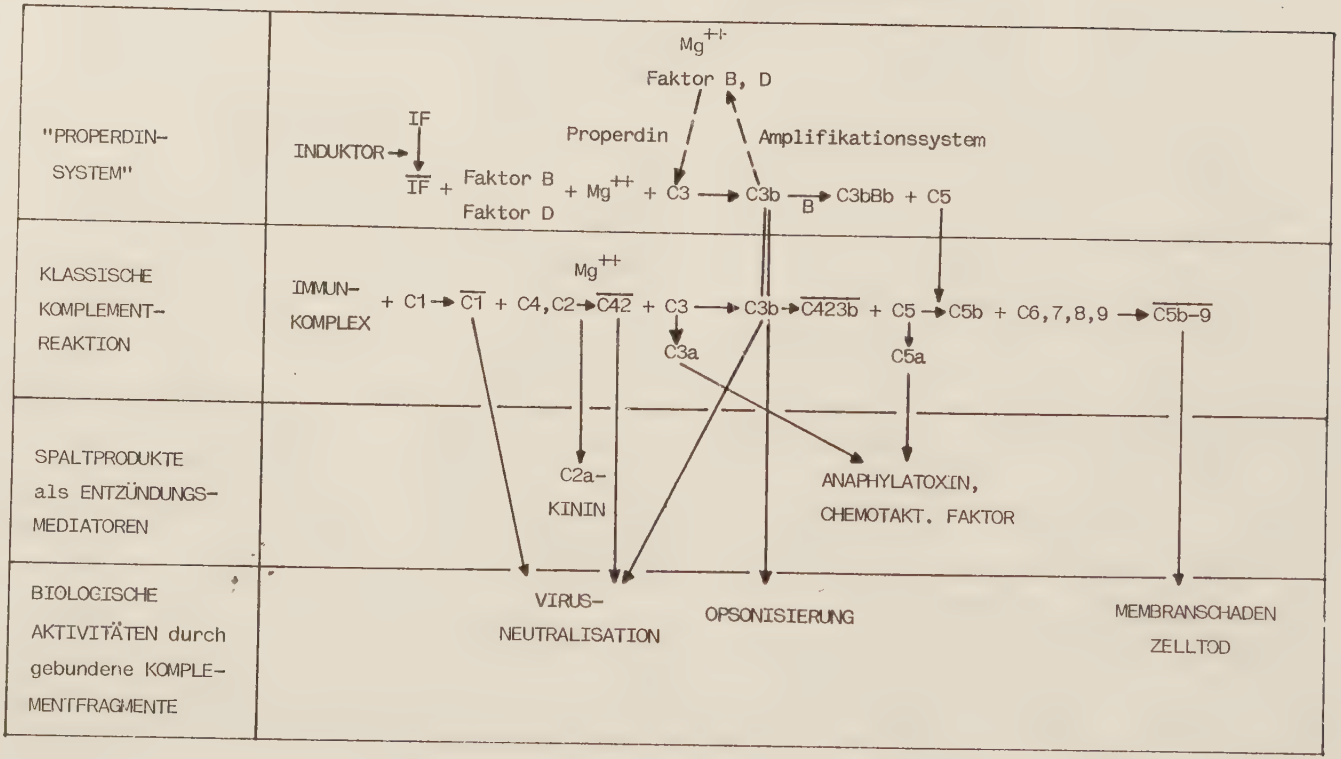
Neben den zellvermittelten unspezifischen Abwehrmechanismen und dem IFN-System sind Serumfaktoren als humorale Komponente an der unspezifischen Abwehr beteiligt. Unter der Bezeichnung "unspezifische Serumfaktoren" faßt man eine Vielzahl unterschiedlicher Substanzen zusammen, die bei der Limitierung von Infektionskrankheiten im Säugerorganismus mitwirken, ohne daß sie Antikörpernatur besitzen. Bei der Abwehr von Virusinfektionen ist vor allem das Komplement-System sowie Properdin und Lysozym von Bedeutung.

Das Komplement-System ist der wichtigste humorale Abwehrfaktor. Es besteht aus 13 sog. echten Komplementkomponenten (C'), die im Serum als inaktive Vorläufermoleküle vorliegen, und 8 Regulatorproteinen. Die Biosynthese der C'-Faktoren erfolgt in Makrophagen (insbesondere in den Kupffer'schen Sternzellen = KC), Monozyten und Lymphozyten, aber auch in Fibroblasten und Darmepithelien (33, 34, 89).
Die Reaktion des Komplement-Systems (vgl. Abb. 4) läuft in drei Phasen ab:

1) die Aktivierungsphase, in der die Proteine bereitgestellt werden, die zur C3-Spaltung führen,
2) die biologische Leistungsphase, in der Komplementfaktoren entstehen, die spezifische biologische Effekte vermitteln,
3) die zytolytische Phase, die auf einer Interaktion des $\overline{C5b-9}$-Komplexes mit Zellmembranen beruht.

Man unterscheidet zwei Mechanismen zur Aktivierung des Komplement-Systems (vgl. Abb. 4), den antikörperabhängigen klassischen Weg und den in der Regel antikörperunabhängigen alter-

Abb. 4: Schema der wichtigsten Komplementreaktionen(modfiziert nach Opferkuch (74)).



nativen Weg. Außerdem ist die direkte enzymatische Spaltung der zentralen Komponente C3 durch Trypsin, Plasmin, Thrombin sowie durch bakterielle und aus traumatisiertem Gewebe freigesetzte Proteasen möglich (7).
Die klassische Komplement-Reaktion führt von der Erkennungseinheit C1 über die Bildung des zentralen C3b-Proteins durch die Aktivierungseinheit (C4/2-Komplex) zur Entstehung der Effektoreinheit $\overline{C5b-9}$ (vgl. Abb. 4). Die Induktion dieser Reaktionskette erfolgt antikörper- und immunkomplexabhängig. Nach neueren Untersuchungen kann es aber auch durch RNA-Viren und Bestandteile von Pneumo- und Staphylokokken sowie durch Polyanionen (wie Heparin, Protaminsulfat) ausgelöst werden (40, 46).
Der zweite Aktivierungsweg, das Properdin-System oder die sog. Nebenschlußreaktion, stellt nach dem heutigen Wissensstand den phylogenetisch älteren Modus dar (7) . Er läuft in der Regel antikörperunabhängig ab, wodurch er als wichtiger Faktor der unspezifischen Frühreaktion zur Abwehr von Krankheitserregern charakterisiert ist. Induktoren des "alternate pathway" sind primär nicht immunogene Stoffe, wie pflanzliche und mikrobielle Polysaccharide (Inulin, Zymosan), bakterielle Lipopolysaccharide, Polyanionen (Dextran, Polyvinylsulfat), das Cobra venom-Toxin und bestimmte Mitogene. Nach neueren Erkenntnissen kann der alternative Weg der Komplement-Reaktion auch durch antigengebundenes oder aggregiertes IgA und IgE sowie durch virusinfizierte, antikörperbeladene Zellen ausgelöst werden (46, 89).

Diese vielfältigen Induktoren aktivieren den sog. Initialfaktor, der durch Zusammenwirken mit den Faktoren B und D aus C3 das C3b-Protein freisetzt, das die Generierung des Effektorkomplexes $\overline{C5b-9}$ initiiert. Als Besonderheit des alternate pathway ist der positive Rückkopplungsmechanismus der C3b-Komponente anzusehen, die zusammen mit Mg^{++}-Ionen den Faktoren B, D und Properdin ein autonomes Amplifikationssystem zur C3b-Bildung entstehen läßt (vgl. Abb. 4). Somit verfügt der Säugerorganismus durch die schnelle Bereitstellung der Komplementfaktoren über einen sofort ein-

setzenden, unspezifischen Abwehrmechanismus (46, 89).
Die biologischen Aufgaben des Komplement-Systems bestehen in der

- Entzündungsvermittlung
- Erregerabwehr
- Hilfestellung bei der Antigenverarbeitung und -präsentation sowie bei der zellulären Kooperation (7).

Als Entzündungsmediatoren fungieren das kininartig wirkende C2a-Spaltprodukt und die als Anaphylatoxine bezeichneten Proteine C3a und C5a. Sie bewirken einerseits eine Kontraktion der glatten Muskulatur, andererseits eine Vasodilatation und erhöhte Gefäßpermeabilität. C3a und C5a fördern die Histamin- und die Serotoninfreisetzung aus Mastzellen und basophilen Granulozyten bzw. aus Thrombozyten und steigern die Enzymabgabe aus Granulozyten und Makrophagen. Auf Phagozyten wirken sie chemotaktisch, wodurch eine Leukozyteninfiltration in das entzündlich veränderte Gewebe zustande kommt (7, 32, 46, 74, 89).

Das Komplement-System besitzt sowohl in der Prä-Immunphase (vorab alternativer Weg) wie auch in der Immunphase (klassischer Weg) eine entscheidende Bedeutung bei der Abwehr von Mikroorganismen. Dabei ist zwischen den eigenständigen Komplementwirkungen und der Kooperation mit anderen unspezifischen wie spezifischen Abwehrkomponenten zu unterscheiden.

Die komplementvermittelte Zytolyse wird durch den Effektor-Komplex $\overline{C5b-9}$ ausgelöst. Der Proteinkomplex dringt in Oberflächenmembranen ein und induziert durch eine Störung des osmotischen Gleichgewichts irreversible Membranläsionen (89). Dies führt zur Lyse von antikörperbeladenen Zielzellen und zur direkten Lysis von Viren, Bakterien, Hefen und Protozoen (7, 33).
Bei der Antigenverarbeitung und -vermittlung stehen das Komplement-System und die Makrophagen in einem engen funktionellen Zusammenhang. Die Kooperation erfolgt hauptsächlich durch das C3b-Protein, das sich an Antigen-Antikörper-Kom-

plexe, an antikörperbeladene Zellen oder sonstiges antigenwirksames Material anlagert. Diese Opsonisierung des Fremdmaterials fördert die Phagozytose, da die Phagozyten C3b-Rezeptoren tragen. Das Zusammenwirken von Komplement und Makrophagen wird auch dadurch erkennbar, daß die Zellen des MPS (insbesondere die KC) selbst Komplementfaktoren (C3, Faktor B, D) zu synthetisieren vermögen (7, 89) . Die C3-Komponente scheint zudem für die Kommunikation und Kooperation von Lymphozyten und Makrophagen und bei der Regulation der B-Lymphozyten-Aktivität von Bedeutung zu sein (7, 33, 46).

Properdin ist ein relativ thermostabiles Globulin des Serums, das in Verbindung mit Komplement und Mg^{++} fähig ist, Bakterien und Protozoen abzutöten, veränderte Erythrozyten zu hämolysieren und Viren zu inaktivieren (Properdin-System nach Pillemer (75)). Umfangreiche Untersuchungen weisen darauf hin, daß das Properdin einen gegen den Hefezellwandextrakt Zymosan gerichteten Antikörper darstellt, der mit einer Vielzahl von Polysaccharidkomplexen und viralen Komponenten kreuzreagieren kann (54).
In dieser Eigenschaft begründet sich auch die Beteiligung des Properdins am alternativen Aktivierungsweg des Komplements (7, 46, 89).

Lysozym ist ein Enzym aus der Gruppe der Glukuronidasen, das die in der Bakterienzellwand vorkommenden Mukopolysaccharide depolymerisiert. Es ist relativ hitzestabil und kann im Blutserum in Leukozyten, Thrombozyten, in Muttermilch, Speichel, Tränenflüssigkeit, Darm-, Nasen- und Vaginalschleim, in Synovia, Knorpel, Sperma sowie folgenden Organen nachgewiesen werden: Gehirn, Eierstock, Hoden, Nieren, Lunge, Leber, Milz und Lymphknoten.
Lysozym wirkt einerseits bakteriostatisch, indem es Redoxprozesse der Bakterien hemmt, andererseits direkt bakteriolytisch auf grampositive Erreger. Dagegen werden gramnegative Bakterien nur nach Einwirken des Antikörper-Komplement-Systems beeinflußt. Lysozym fördert den Vorgang der Phagozytose.

Außerdem weisen stimulierte Makrophagen einen erhöhten lysosomalen Gehalt an Lysozym auf (54, 58).
Dem Lysozym wird auch eine Wirkung auf Viren zugesprochen, wobei die Lysozymempfindlichkeit der Viruspartikel auf einer Komplexbildung des Enzyms mit elektronegativen Virusproteiden beruhen soll (34).

2.1.4.2. Bedeutung von Serumfaktoren bei Virusinfektionen

Verschiedene in vitro-Versuche belegen eine gewisse antivirale Aktivität des Lysozyms. Lysozym vermochte sowohl Vaccinia- wie auch Herpesviren zu inaktivieren und das Rous-Sarkom-Virus (Retrovirus) zumindest temporär zu inhibieren. Außerdem erfolgte keine Vermehrung von Herpes-, MKS- und Poliomyelitis-Virus auf der Chorioallantoismembran, solange in dieser Lysozym nachweisbar war (34).
Über den eigenständigen Effekt des Lysozyms bei Virusinfektionen in vivo liegen nur wenige Untersuchungen vor. So soll die Vorbehandlung von Mäusen mit Lysozym bei der anschließenden Belastungsinfektion mit Influenzavirus zu einer Verkürzung der Viraemie-Phase und zur Virulenzminderung des Virus führen. Eine lysozymbedingte Vermehrungshemmung von Influenzavirus und die Verstärkung der Virusphagozytose wurde bei Infektionsversuchen mit embryonierten Hühnereiern beobachtet (36).

Das Properdin muß aufgrund seiner stabilisierenden Wirkung auf die Reaktionskette des alternativen Aktivierungsweges des Komplement-Systems in engem Zusammengang mit der Komplementfunktion gesehen werden.

Die Bedeutung des Komplements ergibt sich einerseits aus seiner direkten Wirkung auf das Virus, andererseits aus seiner Funktion bei der Entstehung einer Entzündung und aus seiner Vermittlerrolle bei der Antigenverarbeitung und bei der Kooperation der einzelnen Abwehrkomponenten. So bewirken die Komplementfaktoren C1, C2, C4 und C3 eine Virusneu-

tralisierung, indem sie sich an die Virusoberfläche anlagern. Die völlige Umhüllung des Viruspartikels verhindert den Kontakt mit empfänglichen Zellen und somit die Ausbreitung der Virusinfektion (7, 33) . Zugleich wird durch den opsonisierenden Effekt die Elimination der Viren durch Phagozytosevorgänge beschleunigt.
Desweiteren ist das zytolytische Prinzip des $\overline{C5b-9}$-Komplexes gegen Viren wirksam (7, 33, 46, 74) , wobei insbesondere behüllte Viren von der komplementvermittelten Virolyse betroffen sind (39).

Vor allem bei Viren, die über eine Viraemiephase zur Organmanifestation führen (zyklisch verlaufende Virusinfektionen) ist das Komplement-System als unspezifischer Abwehrfaktor von entscheidender Bedeutung. So stimulieren bestimmte Virusarten (Newcastle-Disease-Virus, murines Leukosevirus, Sindbis-Virus) eigenständig sowohl den klassischen wie den alternativen Aktivierungsweg der Komplementreaktion (39).

Ferner ist nachgewiesen, daß Retroviren und das Virus der Vesikulären Stomatitis (VSV) unabhängig von Antikörpern bzw. Immunkomplexen den klassischen Aktivierungsweg des Komplements induzieren und dadurch eliminiert werden (7, 46).

2.2. Grundlagen der Organperfusion

2.2.1. Allgemeines, Begriffsbestimmung

Die Organperfusion wird als Versuchsmodell zur Abklärung zahlreicher Problemstellungen eingesetzt. Unter Organperfusion versteht man die Durchströmung von Körperorganen mittels eines künstlichen Systems mit Perfusionsmedien über die im Organ vorhandenen natürlichen Durchflußbahnen.

Eine Vielzahl von Organen, wie z.B. Herz, Gehirn, Leber und Niere, werden mit Hilfe dieses Versuchsmodells extrakorporal am Leben erhalten und/oder in ihren Funktionen explizit erforscht. Durch geeignete Wahl von Perfusionsmethodik, -system und -medium läßt sich die Organperfusion zur Verwirklichung unterschiedlichster Untersuchungsziele anwenden.

2.2.2. Perfusionsarten, Perfusionssysteme

Nach der Art der Lokalisation des perfundierten Organs unterscheidet man in der Perfusionstechnik zwischen der 'in situ'-Perfusion und der Perfusion des 'isolierten Organs':

a) In situ - Perfusion
   Das Organ wird hierbei während der Perfusion im Tierkörper belassen. Diese Art der Lokalisation empfiehlt sich, wenn sich die Exstirpation des zu perfundierenden Organs schwierig gestalten würde (2, 76).
b) Perfusion des isolierten Organs
   Das Organ wird aus dem Tierkörper entfernt, so daß die Perfusion extrakorporal unter vorgebbaren, konstanten Versuchsbedingungen (z.B. Temperatur, Druck) durchgeführt werden kann (5, 57, 63).

Das zu perfundierende Organ wird mit Hilfe eines künstlichen

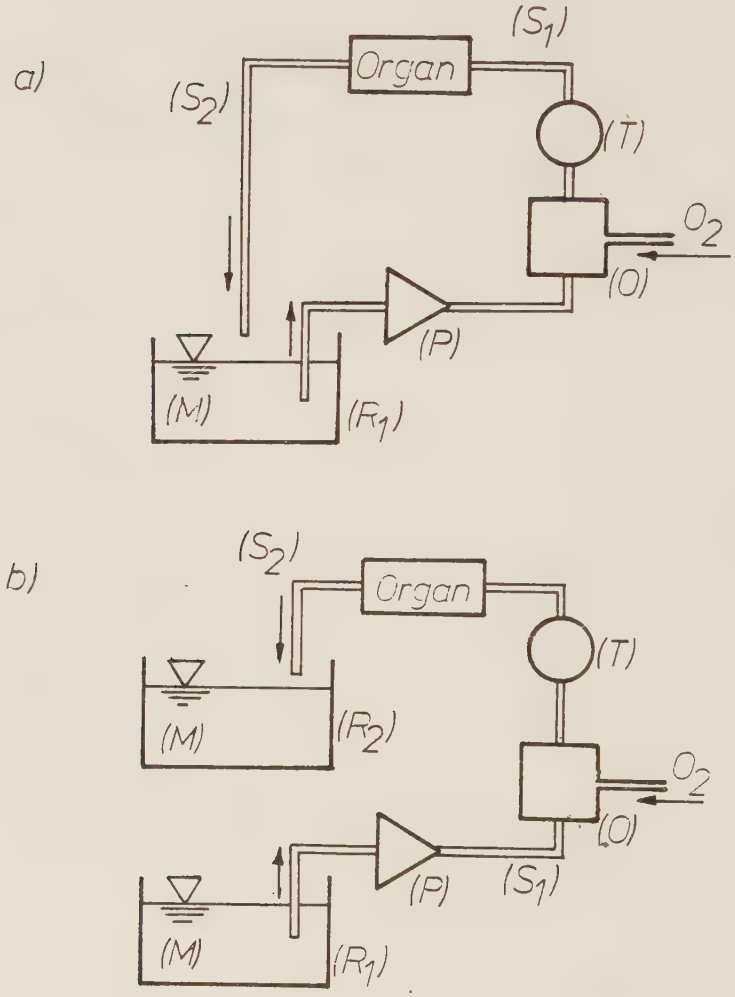
Versuchssystems durchströmt. Nach dem Aufbau dieser Versuchssysteme unterscheidet man grundsätzlich zwischen dem 'offenen' und dem 'geschlossenen' Perfusionssystem.
Beide Systeme weisen stets als Hauptkomponenten auf (vgl. Abb. 5):

- Reservoirgefäß(e) (R_1), (R_2) für das Perfusionsmedium (M),
- ein zum Organ führendes und ein vom Organ abführendes Schlauchsystem (S_1), (S_2),
- eine Antriebspumpe (P),
- einen Oxygenator (O) zur Sauerstoffanreicherung des Mediums,
- einen Tropfkörper (T) zum Abfangen der sich im Medium befindlichen Gasbläschen.

Diese Systemkomponenten können unterschiedlich zusammengesetzt werden für die

a) Perfusion in einem geschlossenen rezirkulierenden System (vgl. Abb. 5a):
   In diesem System fließt das Medium vom Reservoir R_1 zum Organ und wird nach der Organpassage zu diesem Reservoir R_1 zurückgeleitet, so daß es erneut dem Organ zugeführt werden kann.
   Dieses System erfordert ein relativ geringes Volumen an Medium und entspricht besser der Situation in vivo (37).
b) Perfusion im offenen System (vgl. Abb. 5b):
   Bei der offenen Organperfusion strömt das Medium nur ein einziges Mal durch das Organ; der Efflux wird in einem Auffanggefäß R_2 gesammelt (37, 56).
   Dieses System benötigt ein relativ großes Volumen an Medium. Daher werden meist einfache Salzlösungen verwendet. Es hat den Vorteil, daß durch das Organ stets Medium konstanter Zusammensetzung fließt.

Abb. 5: Schematische Darstellung eines
a) geschlossenen Perfusionssystems
b) offenen Perfusionssystems



2.2.3. Perfusionsmedium

Die Perfusionsmedien können in drei Gruppen unterteilt werden:

- Medien, die aus mit physiologischer Kochsalzlösung verdünntem, heparinisiertem Vollblut bestehen.
  Sie bieten die Vorteile, daß sie den physiologischen Bedingungen angepaßt sind und eine große O_2 - Aufnahmekapazität besitzen. Als nachteilig wirkt sich die Anwesenheit von Hormonen und vasoaktiven Substanzen sowie die Notwendigkeit von vielen Spendertieren aus (37).

- halbsynthetische Medien, die aus Salzlösungen unter Zusatz von onkotisch wirksamen Stoffen wie Dextran, Gelatine und Albumin zusammengesetzt sind (18, 43).

  Um den physiologischen Gegebenheiten hinsichtlich der O_2 - Versorgung des perfundierten Organs Rechnung zu tragen, können diesen Perfusionsmedien Erythrozyten entsprechend einem Volumenprozentsatz von 15-30% zugesetzt werden (2,31,63). Anstelle von Erythrozyten findet neuerdings eine Emulsion von Fluorocarbon 43 in dem nichtionischen Detergens Pluronic 68 als O_2-Träger Anwendung (93).Vorteil dieser Medien ist die hohe Sauerstofftransportkapazität.
  Zu den Nachteilen zählen der eigene Stoffwechsel der Erythrozyten, der den Substratspiegel im Medium verändert, die Schwierigkeiten bei Absorptionsmessungen (bedingt durch Hämoglobin) und meist eine progressive Hämolyse (37).

- erythrozytenfreie, gepufferte Elektrolytlösungen (10,37)
  Diese Medien ermöglichen einen hohen Grad an Reproduzierbarkeit, da alle Komponenten einfach und bekannt sind. Die geringe O_2-Aufnahmefähigkeit dieser Medien kann durch Erhöhung der Perfusionsrate überwunden werden (37).

2.2.4. Oxygenierung des Perfusionsmediums

Die Oxygenierung des Mediums dient der O_2-Versorgung des perfundierten Organs. Die adäquate O_2-Versorgung ist vor allem bei Perfusionen notwendig, bei denen in vivo-Verhältnisse weitestgehend nachgeahmt werden sollen (63) und die zur Untersuchung des zellulären Energiestoffwechsels des Organs durchgeführt werden (2).

Dabei kann der Sauerstoff der Perfusionsflüssigkeit
- in physikalisch gelöster Form beigefügt werden oder
- eine O_2-Versorgung des Organs im Zusammenspiel mit im Medium befindlichen Erythrozyten bzw. Fluorocarbon (93) vorgesehen werden.

Der Gasaustausch findet im allgemeinen an Glassäulenfilm- (55), an Scheiben-(43, 44) oder an Membranoxygenatoren (13, 37, 59) statt, die im Perfusionssystem in der Regel im zuführenden Schlauchsystem vor dem Organ eingebaut sind. In ihnen gelangt wasserdampfgesättigtes Carbogen, eine Mischung aus 95% O_2 und 5% CO_2, mit dem Perfusionsmedium in Kontakt, wodurch die O_2-Anreicherung erfolgt.

2.3. Perfusion als Untersuchungsmethode der Leber

Die Leber besitzt eine zentrale Bedeutung im Stoffwechselgeschehen eines Organismus. Sie übernimmt eine Vielzahl komplexer Aufgaben im Protein-, Kohlenhydrat-, Lipid- und Vitaminstoffwechsel und ist durch die Bildung und Sekretion der Galle am Hämoglobinabbau, an der Fettverdauung und an der Entgiftung toxischer

Substanzen beteiligt. Zu diesen vornehmlich von den Parenchymzellen getragenen Aufgaben kommt noch die retikuloendotheliale Funktion der Leber hinzu, welche die Sinusoidzellen insbesondere die Kupffer'schen Sternzellen, vermitteln.

Die Leber war daher Gegenstand vielfältiger Untersuchungen, bei denen sich die Methode der Leberperfusion als vorteilhaft erwies:

- Die perfundierte Leber stellt ein integriertes metabolisches System dar, in dem die Zell- und Gewebsorganisation erhalten ist (32,55) und die Versuchsbedingungen der Situation in vivo weitgehend angeglichen werden können.
- Während des Experiments bleibt die Leber ohne Beeinflussung seitens einer Substrataufnahme und -abgabe durch periphere Gewebe und Organe und ist von der körpereigenen, hormonalen Regulation abgekoppelt (63).
- Die freie, aber gezielte Wahl des Perfusionsmediums und die willkürliche Einflußnahme auf den Zustand der Leber erlauben die Abklärung hepatischer Einzelreaktionen und deren Kinetik (5).
- Die Entnahme von Perfusionsproben zur Auswertung ist technisch einfach und beliebig oft durchführbar, wobei auch jederzeit Teile der Leber für biochemische und ultrastrukturelle Analysen entnommen werden können (32, 55).

2.4. Wichtige Anwendungsgebiete der Leberperfusion

2.4.1. Anwendung der Leberperfusion in der Physiologie und Biochemie

Auf dem Gebiet der Physiologie und Biochemie wurde in grundlegenden Arbeiten überprüft, ob die Leberperfusion als "physiologisches Versuchsmodell" geeignet ist (5,10,55 ,63). Man

war bestrebt, die Versuchsbedingungen so zu optimieren, daß die Ergebnisse aus Leberperfusionen mit jenen aus in vivo-Versuchen weitgehend übereinstimmen (13, 43,61). Zur Beurteilung des Versuchsmodells dienten vor allem der O_2-Verbrauch der perfundierten Leber und ihre Fähigkeit zu biochemischen Leistungen, wie Galleproduktion, Harnstoffsynthese und Glukoneogenese. Den Grad der versuchsbedingten Schädigung der Leber bestimmte man anhand des Laktat-Pyruvat-Verhältnisses, des Austritts von Leberenzymen und des K^+-Verlustes in das Perfusionsmedium (5, 18, 55, 63).

Ferner wurde die Leberperfusion zur Erforschung spezifischer Stoffwechselreaktionen der Leberparenchymzellen herangezogen. Man stellte Versuche zur hormonalen Regulation des Kohlenhydratstoffwechsels (2, 18) und zur Klärung einzelner Reaktionen des Aminosäurenstoffwechsels (10) sowie dessen pathologischer Entgleisung an (76). Ebenso wurde die Beeinflussung des Aminosäuren- und Proteinstoffwechsels durch die H^+-Konzentration im Perfusionsmedium überprüft (61). Mittels Perfusionsversuchen konnten auch genaue Kenntnisse zur Enzymaktivität der Leber erarbeitet werden (32, 66).

Die Perfusionstechnik ermöglichte auch Untersuchungen über die Physiologie der perisinusoidalen Zellen. Die Perfusion der Leber mit Glutaraldehyd erwies sich als optimales Verfahren zur Fixierung des Gefäßsystems und der Zelltypen des Organs für transmissions- und rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen (67, 85,105). Dadurch konnten neben den Endothel- und Kupffer'schen Sternzellen (KC) auch die fettspeichernden Zellen und die bisher nur in der Rattenleber aufgefundenen "pit cells" detailliert beschrieben werden (9, 67,105).

Außerdem findet die Leberperfusion als Versuchsmodell bei der Erforschung der retikuloendothelialen Funktion der Sinusoidzellen breite Anwendung (42, 67, 69, 85).

2.4.2. Anwendung der Leberperfusion in der Pharmakologie

In der Pharmakologie wird die Leberperfusion zur Klärung der Pharmakodynamik von pharmakologisch wirksamen Substanzen in der Leber eingesetzt. So wurde z.B. die Aufnahme und Verteilung sowie der Wirkungsmechanismus des Kupfer-Tyrosin-Komplexes $Cu(Tyr)_2$, der durch seine Superoxiddismutase-artige Aktivität Lipidperoxidationsreaktionen in der Leber beeinflußt, einer genauen Untersuchung unterzogen (37).

Desweiteren bietet die Leberperfusionsmethode die Möglichkeit hepatozelluläre Entgiftungsreaktionen gegenüber Arzneimitteln und toxisch wirkenden Stoffen, wie z.B. die Konjugationsmechanismen Glukuronisierung, Sulfatisierung und Azetylierung, zu erforschen (55).

Ferner bedient man sich der Leberperfusion, um leberschädigende Stoffe der Leber direkt zuzuführen und dadurch den Grad und den Mechanismus der Toxizität dieser Substanzen feststellen zu können. So wurde z.B. für das Herbizid "Paraquat" belegt, daß dessen Toxizität auf der intrahepatischen Lipidperoxidation beruht (17).

2.4.3. Anwendung der Leberperfusion in Spezialgebieten der Chirurgie

Die Leberperfusionstechnik eröffnet auf dem Gebiet der Onkologie neue Möglichkeiten der gezielten Therapie von Lebertumoren und Metastasenbildungen in der Leber. Mit Hilfe dieser Methode können Zytostatika-Konzentrationen durch das Organ perfundiert werden, die in vivo aufgrund ihrer Toxizität nicht toleriert würden (1).

Der experimentelle Einsatz der Leberperfusion zur Präservation von Lebern vor der anschließenden Transplantation des Organs stellt eine weitere Anwendungsmöglichkeit auf dem Gebiet der experimentellen Chirurgie dar. Die Leber bleibt für

einige Stunden bis wenige Tage funktionsfähig, wenn während der Perfusion folgende Bedingungen gegeben sind (16):
- Hypothermie (4°C)
- Oxygenierung unter Überdruck
- verdünntes homologes Blut als Perfusionsmedium, das mit relativ geringer Durchflußrate durch die Leber perfundiert.

Die Möglichkeit einer Gefrierkonservierung der Leber für längere Zeit und die anschließende Vorbereitung der Leber für die Transplantation mit Hilfe der Leberperfusion befindet sich noch im Versuchsstadium (107).

2.5. Anwendung der Leberperfusion in der Infektionsmedizin

2.5.1. Allgemeines

Während in den letzten Jahrzehnten vornehmlich die humoralen Abwehrmechanismen einer intensiven Erforschung unterzogen wurden, wendet man sich in neuerer Zeit mehr der Untersuchung der Abwehr durch zelluläre Komponenten, insbesondere durch Lymphozyten und Makrophagen, zu.
Da die Leber das Organ mit den meisten festsitzenden Makrophagen (Kupffer'sche Sternzellen) ist (21), stellt sie einen wichtigen Faktor bei der zellgebundenen Abwehr dar. Das lymphoretikuläre Gewebe der Leber ist nicht nur die erste Filterstation für das Blut des Gastrointestinaltrakts (4, 88), sondern besitzt generell eine zentrale Bedeutung für die Eliminierung von inerten oder mikrobiellen Fremdpartikeln aus dem Blut (13, 105).

Die Leberperfusion bietet sich als Versuchsmethode zur gezielten Erforschung der Kupffer'schen Sternzellen (=KC) an, da man durch die willkürliche Einflußnahme auf den Leberspender und auf das Pefusionsmedium sowohl nur zellgebundene Abwehrmechanismen (unspezifisch/spezifisch) untersuchen wie auch

deren Beeinflussung durch humorale Faktoren unspezifischer und spezifischer Art überprüfen kann. Somit können Aussagen über den relativen Anteil zellulärer und humoraler Komponenten an der Abwehr von Mikroorganismen getroffen werden. Schließlich läßt sich mit dieser Methode die Phagozytosefähigkeit der KC gegenüber verschiedenen inerten und mikrobiellen Fremdpartikeln relativ gut erfassen.

2.5.2. Leberperfusion zur Untersuchung von Clearance und Phagozytose

2.5.2.1. Definition der Begriffe Clearance und Phagozytose

Intravenös verabreichte Fremdpartikel verschwinden nach kurzer Zeit und zu einem erheblichen Prozentsatz aus der Zirkulation. Dieses Phänomen bezeichnet man als "Blutclearance" (81) . Dabei ist der Ausdruck "Clearance" dem Gebiet der Nierenfunktionsprüfung entlehnt, womit das Ausscheidungsvermögen eines Stoffes aus dem Plasma durch die Niere beschrieben wird.

Mit Hilfe der Leberperfusionstechnik konnte die hepatische Clearance portal zufließender Fremdpartikel bestimmt werden, wobei der Begriff Clearance das Ausmaß der Retention partikulären Materials aus dem Perfusionsstrom durch die Leber charakterisiert.
Derjenige Anteil am zugeführten partikulären Material, der nach der Perfusion weder im Perfusat noch in der Leber wieder auffindbar ist, wird als phagozytiert betrachtet. Dabei versteht man unter hepatischer Phagozytose die Aufnahme und den Abbau von fremden inerten Partikeln, von veränderten korpuskulären Elementen sowie von Mikroorganismen durch die Lebermakrophagen.

2.5.2.2. Untersuchungen mit inerten Partikeln und korpuskulären Elementen

Bei Perfusionen, die zur Untersuchung der retikuloendothelialen Funktion der Leber gegenüber inerten Fremdpartikeln dienten, setzt man dem Medium Substanzen unterschiedlichster Art als Testpartikel zu, wie z.B. Tusche (85), Latexpartikel (105), kolloidales Gold (42). In der Regel konnte eine erhebliche Filterkapazität der Leber gegenüber den verschiedenen Testpartikeln festgestellt werden, wobei die Clearance von Größe, Menge und Oberflächenbeschaffenheit der Fremdpartikel abhängig war (81) . Perfusionen von Rattenlebern mit kolloidalem Gold bewiesen, daß eine hepatische Clearancefunktion auch ohne die Anwesenheit von Serumfaktoren im Medium vorhanden ist. Der Zusatz von Plasma zum Medium vermochte die Clearance allerdings noch zu steigern (42).

Desweiteren konnte eine Clearancefähigkeit der Leber gegenüber veränderten bzw. körperfremden korpuskulären Elementen festgestellt werden. Bei Perfusionsversuchen mit chemisch bzw. immunologisch veränderten körpereigenen Erythrozyten wurden die chemisch alterierten roten Blutkörperchen in großer Zahl und schneller als die antikörperbeladenen Erythrozyten von den KC aus dem Perfusionsstrom entfernt (69).

Elektronenoptische Untersuchungen der mit verschiedenen Tumorzellarten perfundierten Lebern beweisen, daß die KC eine unspezifische Clearancekapazität auch gegenüber Tumorzellen besitzen. Die Fähigkeit zur Phagozytose dieser Fremdzellen war von der Art der Tumorzellinie abhängig. Bei einigen Zelltypen (v.a. aus soliden Tumoren) konnte der lysosomale Abbau in den KC dargestellt werden, während andere Tumorzellarten (v.a. aus Systemblastomen des lymphoretikulären Gewebes) die KC als Ausgangspunkt für die Infiltration in das Leberparenchym benutzten oder von den KC nicht inkorporiert wurden (82).

2.5.2.3. Untersuchungen mit Bakterien

Bei den Untersuchungen mit Bakterien diente der Gehalt an vermehrungsfähigen Keimen in den Perfusionsproben zur quantitativen Ermittlung des Clearance- und Phagozytosewertes. Zur Bestimmung der Anzahl koloniebildender Einheiten (CFU) wurde das Plattenzählverfahren verwendet.

Der Clearancewert W_{Cl} ist ein Maß für die während der Perfusion in der Leber zurückgehaltenen Bakterien; er wird definiert als Differenz zwischen der Anzahl koloniebildender Einheiten im Medium zu Beginn der Perfusion (CFU_A) und jener des Efflux aus der Leber (CFU_E) bezogen auf CFU_A:

$$W_{Cl} = \frac{CFU_A - CFU_E}{CFU_A} \cdot 100\%$$

Der Phagozytosewert W_{Ph} stellt ein Maß für die während der Perfusion von den Lebermakrophagen inaktivierten Bakterien dar. Zur Berechnung des Phagozytosewertes W_{Ph} ist es erforderlich, neben der CFU_A und CFU_E auch die Anzahl koloniebildender Einheiten im Leberhomogenisat (CFU_L) zu bestimmen. Der Phagozytosewert ist folgendermaßen definiert:

$$W_{Ph} = \frac{CFU_A - CFU_E - CFU_L}{CFU_A} \cdot 100\%$$

Viele Autoren führen die experimentell ermittelte Inaktivierung der Bakterien auf eine Phagozytose zurück. In vielen Fällen wird dabei der Nachweis einer Inaktivierung durch die Lebermakrophagen gemäß der Begriffsbestimmung "Phagozytose" vermißt.

Mit Hilfe des Vesuchsmodells der Leberperfusion konnte eine hepatische Clearance- und Phagozytosekapazität gegenüber Bakterien nachgewiesen werden. Dabei sind Clearance und Phagozytose maßgeblich von der Art des Bakteriums (obligat extra-

zellulär/fakultativ oder obligat intrazellulär (81)) sowie vom wirkenden Abwehrmechanismus (spezifisch/unspezifisch; zellulär/humoral) abhängig.

Bei Perfusionen mit dem gramnegativen Enterobakterium Salmonella typhimurium bestand auch bei Abwesenheit humoraler Komponenten ein hohes Clearancevermögen der Leber, das auf einer unspezifischen Reaktion der Lebersinuoide mit den Mikroorganismen beruhte. Eine nennenswerte Abtötung abgefangener Bakterien wurde bei diesem nur auf zellulären Abwehrkomponenten basierenden Modell nicht festgestellt. Für eine wirksame bakterizide Aktivität der Leber war die Anwesenheit humoraler Faktoren erforderlich (65).

Dabei ist zu berücksichtigen, daß die durch den Serumzusatz erzielte Inaktivierung von Salmonellaspezies nicht nur auf einem die retikuloendotheliale Funktion fördernden Effekt beruht, sondern auch auf die eigenständige bakterizide Wirkung der Serumbestandteile zurückzuführen ist (84).

Dagegen war bei Leberperfusionen mit vermehrungsfähigen BCG-Mikroorganismen (Mycobacterium tuberculosis) keine Inaktivierung dieser obligat intrazellulären Erreger durch die Serumbakterizidie zu ermitteln. Für Clearance und Inaktivierung sind hierbei die Aufnahme und der Abbau der BCG-Organismen durch die KC verantwortlich (83).

Bei Perfusionen mit dem gramnegativen Bakterium Pseudomonas aeruginosa konnte auch ohne den Zusatz von Serum zum Medium eine hepatische Phagozytosefähigkeit nachgewiesen werden. Man stellte ferner fest, daß bei Zugabe von Serum die Inaktivierungsrate auch durch die Herkunft des Serums (konventionell/keimfrei gehaltene Serumspender) beeinflußt wird. Während mittels Serum von konventionellen Spendern die hepatische Inaktivierungsfähigkeit erhöht wurde, bewirkte Serum von keimfreien Spendern keine Steigerung (56).

Der Effekt einer Immunisierung von Leber- und Serumspendern auf die Abwehrfähigkeit der Leber wurde bei Perfusionen mit

dem grampositiven Erreger Staphylococcus aureus und dem gramnegativen Enterobakterium Salmonella enteritidis untersucht (12). Im Falle von Sta. aureus blieb der immunologische Status der Leber- und Serumspender ohne Auswirkung auf Clearance und Phagozytose. Bei der hepatischen Abwehr des grampositiven Bakteriums scheinen spezifische zelluläre wie humorale Immunkomponenten von geringer Bedeutung zu sein. Dagegen konnte bei Perfusionen mit gramnegativen S. ent. eine maßgebliche Steigerung durch humorale wie zelluläre Immunkomponenten nachgewiesen werden.

Zur Überprüfung der Mitwirkung zellulärer Mechanismen an der hepatischen Abwehr wurden die Lebermakrophagen durch bestimmte Toxine (S. ent.-Lipopolysaccharid, Silica) geschädigt. Eine solche Vorbehandlung der Leberspender führte zu einer Verminderung der Clearance- (31, 84) und der Phagozytosekapazität (84). Die Bedeutung der KC als wichtige Filterstation gegenüber Bakterien wird auch dadurch bestätigt, daß ihre Schädigung eine systemische Verbreitung der Keime zur Folge hat. Dies belegen in vivo-Versuche mit Mäusen, die nach Silica-Behandlung eine erheblich erhöhte Empfänglichkeit gegenüber S. typhimurium aufwiesen (31).

Die Stimulierbarkeit der unspezifischen Abwehr der Leber keimfrei aufgezogener Ratten durch Vorbehandlung mit dem Paramunitätsinducer "PIND-AVI" wurde bei Perfusionen mit dem gramnegativen Mikroorganismus Pseudomonas aeruginosa überprüft. Die Paramunisierung der keimfreien Ratten bewirkte eine Erhöhung der unspezifischen Clearance- und Phagozytosekapazität der Leber, wobei insbesondere die humorale Abwehrkomponente durch die Vorbehandlung mit "PIND-AVI" stimuliert wurde (57).

2.5.2.4. Untersuchungen mit Pilzzellen

Bei den vorliegenden Leberperfusionsversuchen mit Pilzzellen basiert die Bestimmung des Clearancewertes W_{Cl} und des Phagozytosewertes W_{Ph} ebenfalls auf der Ermittlung der Anzahl koloniebildender Einheiten (CFU); es gelten dieselben Definitionen für den Clearance- und Phagozytosewert, wie sie in 2.5.2.3. bei den Untersuchungen mit Bakterien angegeben sind.

Als Testkeim wurde bei sämtlichen Versuchen stets die fakultativ pathogene Hefe Candida albicans verwendet.
Bereits ohne die Anwesenheit humoraler Faktoren im Perfusionsmedium konnte eine sehr große Clearancekapazität gegenüber den Pilzzellen nachgewiesen werden (4, 86, 88) . Die erhebliche, auf rein zellulären Abwehrmechanismen begründete Filterfunktion ließ sich durch Zusatz von homologem Serum noch steigern (4) . Man stellt jedoch keine (86) bzw. nur eine relativ geringe (88) Inaktivierungsfähigkeit der perfundierten Leber gegenüber Candida albicans fest.
Bei Perfusionsversuchen mit Mäuselebern erhöhte die Zugabe von Candida-spezifischem Immunserum (vom Rind) zum Medium sowohl die hepatische Clearance- wie auch die Inaktivierungskapazität. Ein Zusatz von normalem Serum (vom Kalb) oder auch die Vorbehandlung der Leberspender mit Glucan (RES-Stimulans aus Zellwandbestandteilen von Sacchromyces cerevisiae) wirkte sich nicht fördernd auf die Abwehrfunktion der Leber gegen Pilzzellen aus. Jedoch eine Kombination aus diesen beiden Maßnahmen (Glucanvorbehandlung, Kälberserumzusatz) brachte eine Steigerung von Clearance und Inaktivierung (88).

Über die Mitwirkung der Lebermakrophagen bei der Abwehr von Pilzzellen liegen unterschiedliche Ergebnisse vor.
Elektronenoptische Untersuchungen der Rattenleber nach Perfusion mit Candida albicans bewiesen, daß die Pilzzellen zu einem hohen Prozentsatz in den Lebersinusoiden abgefangen waren. Eine Phagozytose durch die Lebermakrophagen konnte nicht festgestellt werden (86) . Dagegen folgerte man aus

der Verringerung der Clearance- und Inaktivierungswerte bei Perfusion silicageschädigter Mäuselebern eine entscheidende Bedeutung der KC_{γ} für die Abwehr von Candida albicans (88).

3. Eigene Untersuchungen

3.1. Grundlagen der Versuchsplanung

Zur Überprüfung der hepatischen Virusabwehr wurde die Perfusion der isolierten Rattenleber herangezogen. Hierbei fand das offene Perfusionssystem Anwendung, da mit dieser Methode stets Virusperfusat mit konstantem Virusgehalt der Leber zugeführt werden kann. Die Versuchsbedingungen sind entsprechend der Aufgabenstellung so gewählt worden, daß explizit die zellgebundene unspezifische Abwehr der Leber untersucht werden konnte:

- Als Perfusionsmedium wurden Virussuspensionen verwendet, denen weder Erythrozyten noch Plasma oder Serum von immunisierten bzw. nicht immunisierten Versuchstieren zugesetzt waren. Dadurch wurde der exogene Einfluß spezifischer wie unspezifischer humoraler Komponenten auf die retikuloendotheliale Funktion der Leber ausgeschaltet.
- Durch eine Vorperfusion mit gepufferter Elektrolytlösung vor der Virusperfusion ließen sich Auswirkungen endogener humoraler Faktoren ausschließen.
- Als Virusperfusate dienten vorwiegend Virussuspensionen, die heterologes Virus enthielten. Somit war die Wahrscheinlichkeit gering, daß die Leberspender aus konventioneller Haltung gegen das im Versuch perfundierte heterologe Virus durch früheren Antigenkontakt spezifisch geprägt waren.

Da die Gruppe der Östrogene nachweislich Phagozytosevorgänge in der Leber steigert (25, 94), wurden in den Perfusionsversuchen männliche Versuchstiere als Leberspender verwendet, um zykulssynchrone, östrogenbedingte Einflüsse auf die retikuloendotheliale Funktion der Leber auszuschließen.

Die Abwehrfunktion der Leber gegenüber Viren wurde mittels "Virusclearance" und Virusinaktivierung" durch die Leber bestimmt.

Dazu wurden die Virusproben (Perfusatproben und Leberhomogenisate) im quantitativen Virusnachweis über Zellkulturen ausgewertet.

In den ersten Versuchen (Versuchsabschnitt I) dienten konventionell gehaltene Ratten als Leberspender. Perfundiert wurde mit vier verschiedenen Virusarten, die in Herkunft (heterolog, homolog), Größe (ca. 300 nm - 100 nm - 60-80 nm) und Aufbau (komplex gebaut - behüllt - nackt) differierten.

Immunofluoreszenztechnische Untersuchungen an Lebergewebsproben sollten qualitativen Aufschluß darüber bringen, ob die hepatische Abwehrfunktion auf einer Interaktion der Sinusoidzellen mit den verschiedenen Virusarten beruht.

Letztlich sind elektronenoptische Untersuchungen von Lebergewebsschnitten durchgeführt worden, um zu überprüfen, ob die Kupffer'schen Sternzellen für die hepatische Virusabwehr verantwortlich sind und die Phagozytose von Viruspartikeln als Mechanismus der Virusinaktivierung nachweisbar ist.

Die weiteren Versuche (Versuchsabschnitt II) sollten abklären, ob die unspezifische zellgebundene Virusabwehr in der Leber medikamentell stimulierbar ist. Hierfür wurden keimfrei aufgezogene Ratten vor der Leberperfusion subkutan (systemische Reaktion) mit biologischen Inducern vorbehandelt, von denen bekannt ist, daß sie die unspezifische Abwehr stimulieren.

3.2. Material und Methoden

3.2.1. Versuchstiere

Bei den Versuchstieren aus konventioneller Haltung handelte es sich um männliche SPF-Ratten der Rasse WISTAR, WU/Kißlegg. Sie wurden in Makrolonkäfigen unter Standardlaborbedingungen gehalten. Wasser und Pelletfutter (Altromin^{R} für Ratten und Mäuse) standen den Tieren ad libitum zur Verfügung.
Das Lebendgewicht zum Zeitpunkt der Perfusionsversuche betrug 350-550 g (Versuchsabschnitt I).
Die keimfrei aufgezogenen Versuchstiere wurden von der Sektion Gnotobiotik der Zentralen Versuchstieranlage der Universität Ulm bezogen. Bis zur Verwendung im Perfusionsversuch lebten die "keimfreien Tiere" unter Standardlaborbedingungen in gegen die Umwelt keimdicht präparierten, autoklavierten Makrolonkäfigen. Sie bekamen UV-bestrahlte Altromin^{R}-Pellets sowie steril filtriertes Leitungswasser ad libitum.
Im Versuchsabschnitt II dienten keimfreie männliche Inzuchtratten der Rasse BD-IX als Leberspender; sie wurden bei einem Gewicht von 330-380 g für den Perfusionsversuch herangezogen.

3.2.2. Virusmaterial

Die Untersuchungen über die Clearance- und Inaktivierungskapazität der Rattenleber sind mit vier verschiedenen Virusarten durchgeführt worden:
1) Geflügelpockenvirus (Avipoxvirus gallinae): Stamm HP-1,

vermehrt auf primären Hühnerembryofibroblasten (FHE)-Kulturen in der 442. Passage.

Die Virusernte erfolgte jeweils bei einem zytopathischen Effekt (cpE) von 25-30% Zerstörung und 65-75% Abkugelung des Zellrasens (3. bzw. 4. Tag p.i.).

Die Titer der als Perfusionsmedium verwendeten Virusernten lagen bei den Versuchen mit konventionell gehaltenen Ratten zwischen $10^{-7,1}$ und $10^{-7,6}$ pro ml Virussuspension, bei den Experimenten mit keimfrei aufgezogenen Tieren zwischen $10^{-6,39}$ und $10^{-7,18}$.

2) Newcastle-Disease-Virus (lentogener Stamm Hitchener B1): Das Virus wurde über die Allantoishöhle 10 Tage bebrüteter Hühnereier vermehrt und am Höhepunkt der Virusvermehrung geerntet (2.-3. Tag p.i.). Der Virusgehalt der Ernten schwankte zwischen $10^{8,1}$ bzw. $10^{7,475}$ pro ml Virussuspension (KID_{50}/ml, FHE-Kulturen).

3) Reovirus (aviär, Stamm 118): Die Virusvermehrung erfolgte in primären FHE-Kulturen. Das Virus wurde am 3. Tag bei einem cpE von 20-35% Zerstörung und 65-80% Degeneration geerntet. Die Viursernten hatten einen Virusgehalt von $10^{8,6}$ bzw. $10^{8,35}$ pro ml Suspension.

4) Reovirus (Säugertyp 1, Stamm Lang): Für die Vermehrung wurden VERO-Zellkulturen (=permanente Affennierenzellen) benutzt. Die Ernte erfolgte am 3. Tag p.i. bei einem cpE von 60-80% Zellzerstörung und 15-35% granulierter Degeneration des Zellrasens. Für die einzelnen Viruserntен wurden Virustiter zwischen $10^{-7,725}$ und $10^{-7,1}$ pro ml Suspension ermittelt.

Die Viruserntен wurden bis zum Perfusionsversuch bei $-70^{\circ}C$ gelagert.

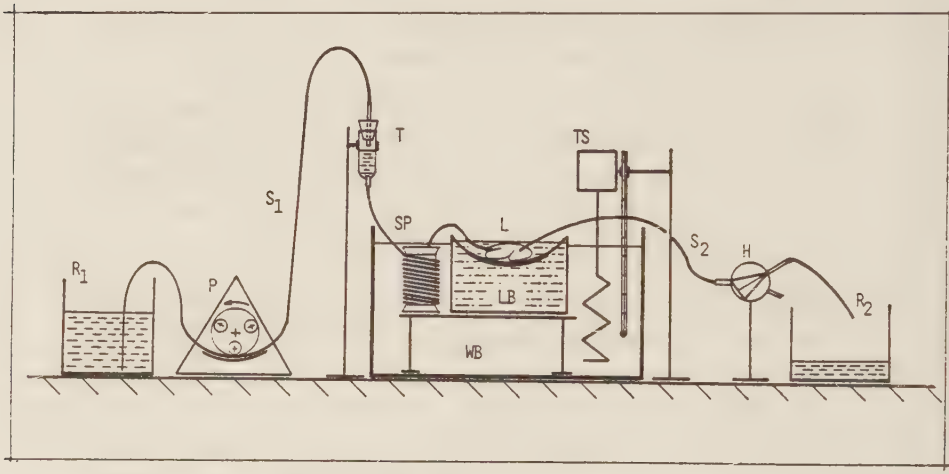
3.2.3. Leberperfusion

3.2.3.1. Perfusionssystem

Es handelte sich um ein offenes Perfusionssystem, das aus drei Systemabschnitten bestand (vgl. Abb. 6):

- einem Teilsystem für die Zufuhr von Medium zum Organ,
- einem Teilsystem zum Abführen des Mediums vom Organ und
- einer Vorrichtung zur Aufnahme der isolierten Leber während der Perfusion.

Abb. 6: Schematische Darstellung des Perfusionssystems



Das Teilsystem zur Zufuhr des Mediums bestand aus einem Vorratsbehälter (R_1) für das Perfusionsmedium, einer Rollerpumpe (P) zur Förderung des Mediums und dem zuführenden Teil des Schlauchsystems (S_1).
Als Mediumreservoir diente ein Glasgefäß mit einem Fassungsvermögen von 500 ml. Eine stufenlos regelbare Rollerpumpe

(H.R. Flow Inducer der Fa. Watson-Marlow Ltd., England) beförderte das Perfusionsmedium mit einer durchschnittlichen Geschwindigkeit von 5 ± 1 ml/Min. bei einem mittleren Druck von 150 mm Wassersäule (gemessen im Schlauchsystem vor der Leber) durch das Versuchssystem. Ein Tropfkörper (T) garantierte einen konstanten, blasenfreien Durchfluß. Der zum Tropfkörper führende Silikonschlauch hatte einen Innendurchmesser von 3 mm, der von dort abführende Teil 1 mm.

Das Teilsystem zum Abführen des Mediums vom Organ bestand aus dem abführenden Schlauchsystem (S_2), einem Dreiwegehahn (H) zum Ableiten der Perfusatproben und den Auffanggefäßen (R_2) zur Aufnahme des passierten Mediums.

Als Kanüle zur Insertion in die Pfortader (zuführender Ast) und in die Vena cava caudalis (abführender Ast) diente jeweils ein schräg angeschliffener Teflonschlauch mit einem Außendurchmesser von 1mm und einer Länge von 25 mm.

Das Teilsystem mit der Vorrichtung zur Aufnahme der isolierten Leber bestand aus dem "Leberbad" (LB) und dem "Wasserbad" (WB). Als Leberbad wurde ein Aluminiumgefäß (Durchmesser 20 cm, Höhe 15 cm) verwendet, in dem entsprechend dem Prinzip einer Hängematte Seidengaze (22 cm x 7 cm) gespannt war. Hierauf lag die Leber (L) nach der Exstirpation aus dem Tierkörper. Das perfundierte Organ war von phosphatgepufferter Saline (PBS + 1 % $NaHCO_3$; pH 7,2) umgeben, die durch Wärmeübertragung vom Wasserbad auf das Organ für temperaturkonstante Verhältnisse während der Perfusion sorgte und eine oberflächliche Austrocknung der Leber verhinderte. Eine Kunststoffwanne (35 x 30 x 25 cm), die mit Aqua dest. gefüllt war, diente als Wasserbad (WB). Die Wassertemperatur hielt ein temperaturgeregelter Tauchsieder (TS) konstant auf 38°C. Im Wasserbad stand außer dem Leberbadgefäß noch ein Kunststoffzylinder (SP) (Durchmesser 60 mm, Länge 100 mm), auf dem das zuführende Schlauchstück hinter dem Tropfkörper aufgewickelt war, so daß das zum Organ strömende Perfusionsmedium ebenfalls auf 38°C erwärmt wurde.

Auf den Einbau eines Oxygenators in das Versuchssystem wurde verzichtet, da die Dauer der einzelnen Perfusionen relativ kurz war.

3.2.3.2. Perfusion

Chirurgischer Eingriff

Das zu- und abführende Perfusionsteilsystem sowie die Operationsbestecke wurden vor jedem Perfusionsversuch autoklaviert; das Gefäß zur Aufnahme des Leberbades wurde durch UV-Licht sterilisiert.

- Präoperative Phase
  Konventionell gehaltene Versuchstieren wurden 16-20 h vor Operationsbeginn das Futter entzogen. Bei keimfrei aufgezogenen Versuchstieren erfolgte dies nicht, um eine Kontamination zu vermeiden.
  Vor dem chrirugischen Eingriff wurden die Versuchstiere narkotisiert (kurzzeitig Äther pro narcosi^{R} (Fa. Hoechst) und anschließend i.p.-Verabreichung von Natrium-Pentobarbital (Nembutal^{R} - Abott); 6mg/100g KG).

- Anlegen der Perfusion
  Für den chirurgischen Eingriff war das narkotisierte Tier auf einem Operationstisch für Labortiere (Fa. Braun, Melsungen) fixiert und das Operationsgebiet mit 70%igem Alkohol desinfiziert. In die mit einem Hautschnitt freigelegte Vena femoralis injizierte man zur Hemmung der Blutgerinnung Heparin (1000 IE/Tier ≙ 0,2 ml Heparin^{R} de Novo).

Die Operation wurde nach der Methode von Miller (60) durchgeführt. Dabei wurde zunächst mit einem Medianschnitt und

zwei Entlastungsschnitten die Bauchhöhle eröffnet, um Zugang zur kaudalen Hohlvene und zu der im Mesenterium verlaufenden Pfortader zu bekommen. Danach wurden folgende Ligaturen gesetzt, wobei für sämtliche Ligaturen feines Nahtmaterial (Filovet-Bengen^{R}, WdT) verwendet wurde:

- eine Ligatur um die V. cava caud. vor der Abzweigung der V. renalis dextra (nur locker geknüpft)
- je eine Ligatur um die V. pancreaticoduodenalis sowie um den Ductus biliferus samt A. hepatica (beide sofort festgezogen),
- eine Doppelligatur um die V. portae (jeweils nur locker geknüpft).

Unter Zufluß von Vorperfusionsmedium erfolgte die Insertion der Teflonkanüle des zuführenden Schlauchsystems in die V. portae. Die V. cava caud. wurde caudal der Niere eröffnet, damit das Blut-Vorperfusat-Gemisch abfließen konnte, und die Kanüle in der V. portae endgültig fixiert.
Nach der Eröffnung des Brustkorbes wurde die Teflonkanüle des abführenden Schlauchsystems in den thorakalen Teil der V. cava caud. in Herzohrnähe eingeführt und mit zwei Ligaturen fixiert. So konnte nach dem Verschluß der abdominalen V. cava caud. das Vorperfusat über den thorakalen Teil der Hohlvene abfließen. Das Anlegen der Perfusion nahm durchschnittlich 3-5 Minuten in Anspruch.

- Isolierung der Leber
Nach der Durchtrennung der Leberbänder zu Magen und Milz und dem Absetzen des Ösophagus wurden Magen und Darmkonvolut aus ihrer Verankerung gelöst sowie die Milz entfernt. Anschließend erfolgte die Präparation der abdominalen und thorakalen Lebergefäße und die Durchtrennung des Zwerchfells.
Die Exstirpation der Leber mit dem Umsetzen in das Leberbad fand bei fließendem Perfusionsmedium statt.

Vorperfusion

Die Vorperfusion hatte den Zweck, Erythrozyten und Plasmabestandteile (v.a. Serumproteine) des Leberspenders aus dem Organ zu entfernen und dauerte ca. 40 Minuten (bei einer Durchflußmenge von 200 ml im Versuchsabschnitt I) bzw. 20 Minuten (bei 100 ml Durchflußmenge im Versuchsabschnitt II).

Als Medium wurde hierfür eine gepufferte Elektrolytlösung mit Glukose-, Aminosäuren- und Vitaminzusatz benutzt, dem zur Gerinnungshemmung Heparin zugefügt war. Es bestand aus Earle's MEM mit einem Anteil von 1,5% 1M HEPES und 10 IE/ml HEPARIN. Der pH-Wert wurde mit 0,3 N NaOH auf 7,4 bis 7,6 eingestellt.

Virusperfusion

Als Medium für die Virusperfusion dienten die Virusernten mit den in 3.2.2. angegebenen Virustitern.
Im Versuchsabschnitt I lag die Menge des Virusperfusats zwischen 220 und 290 ml. Die Perfusionen dauerten bei einer mittleren Durchflußrate von 5 $\pm$ 1 ml/Min. zwischen 35 und 50 Minuten.
Im Versuchsabschnitt II wurden ausschließlich HP-1-Virussuspensionen verwendet, wobei das Virusperfusatvolumen 200 ml betrug; die Hauptperfusion lief über einen Zeitraum von 35 bis 40 Minuten.
Proben der Virussuspension entnahm man vor der Perfusion aus dem Vorratsgefäß und nach der Perfusion aus dem Auffangreservoir. Zur Untersuchung der Clearancekinetik wurden im Versuchsabschnitt I über den Dreiwegehahn auch während der Perfusion Perfusatproben von jeweils 10 ml in Zeitintervallen von 10 bzw. 15 Minuten gezogen.

Aufbereitung und Konservierung der Versuchsproben

Die gewonnenen Perfusatproben wurden nach Beendigung der Perfusion portioniert (je 5 x 2 ml), bei -70°C eingefroren und gelagert. Die Leber wurde mit einer Salzlösung (PBS + 1% $NaHCO_3$) gewaschen und bei -70°C für weitere Untersuchungen aufbewahrt.

3.2.4. Quantitativer Virusnachweis in den Versuchsproben

Die quantitative Bestimmung des Virusgehalts der gezogenen Perfusatproben wurde zur Ermittlung von Ausmaß und Verlauf der hepatischen Clearance durchgeführt.
Um den Grad der Inaktivierung erfassen zu können, mußte außerdem die Leber auf den Gehalt an infektiösem Virus überprüft werden, wozu die Homogenisierung der Leber notwendig war. Nach dem Auftauen wurde das Organ mit der Schere grob zerkleinert und mit Hilfe von sterilem Seesand (Merck, Art. 7711, gereinigt) im Mörser zerrieben. Dabei wurde als flüssige Trägerkomponente nach und nach phosphat-gepufferte Salzlösung (insgesamt 100 ml PBS) zugesetzt. Die so entstandene Suspension wurde zum vollständigen Zellaufschluß 10 Minuten lang mit Ultraschall (Sonifier^R Cell Disruptor B 30) behandelt, wobei die Lebersuspension in einem Eisbad gekühlt wurde. Nach mehrmaligem Abzentrifugieren (15 Minuten bei 800 · g) wurde der virushaltige Überstand portioniert und bis zur Bestimmung des Virusgehaltes bei -70°C gelagert bzw. sofort verwendet.

Die Bestimmung des Virusgehalts erfolgte durch Titrierung der Infektiosität in empfänglichen Zellkulturen. Der Virustiter wurde nach der Methode von Spaerman und Kärber (11) berechnet (Beobachtungszeitraum von 7 Tagen p.i.). Er wird als diejenige kulturinfektiöse Dosis von 50% (KID_{50}) angegeben, die in 1 ml der virushaltigen Probe enthalten ist (80).

Für die drei verwendeten aviären Viren dienten primäre FHE-Kulturen als Nachweissystem, für das Säuger-Reovirus VERO-Zellkulturen. Bei den Perfusatproben wurde das Mikrotiterverfahren (Kulturplatten Falcon® 3040 der Fa. Becton Dickinson) benutzt, bei den Lebersuspensionen fand das Makroverfahren mittels Titrierung in Zellkulturröhrchen Anwendung. Dabei wurden Verdünnungsreihen in 10er-Potenzen angelegt und 4 oder 8 Reagenten pro Verdünnungsstufe vorgegeben. Jede Perfusat- oder Lebersuspensionsprobe wurde mindestens zweifach untersucht, so daß sämtliche Ergebnisse als Mittelwert von mehreren Titrationen erscheinen.

3.2.5. Bestimmung der Clearance

3.2.5.1. Clearancewert bei Virusperfusion

Der Clearancewert W_{Cl} wird analog dem Clearancewert bei den Untersuchungen mit Bakterien und Pilzzellen (vgl. 2.5.2.3.) wie folgt definiert:

$$W_{Cl} = \frac{KID_{50}/ml_A - KID_{50}/ml_E}{KID_{50}/ml_A} \cdot 100\%,$$

wobei gilt: KID_{50}/ml_A = Gehalt an infektiösem Virus pro ml Ausgangsperfusat

KID_{50}/ml_E = Gehalt an infektiösem Virus pro ml des über die gesamte Perfusionsdauer gesammelten Efflux (Endperfusat).

Der Clearancewert W_{Cl} gibt den Prozentsatz des im Efflux nicht mehr wiedergefundenen Virusgehalts bezogen auf den Virusgehalt des Ausgangsperfusats an.

3.2.5.2. Ermittlung der Clearancekinetik

Zur Beschreibung des zeitlichen Verlaufs der Clearancekapazität der Leber gegenüber Virus wurde der Virusgehalt der während des Perfusionsversuches zu bestimmten Zeitpunkten t gezogenen Perfusatproben $KID_{50}/ml_{P(t)}$ ermittelt.
Setzt man diesen in den Proben reisolierten Virusgehalt in Bezug zum Virusgehalt des Ausgangsperfusats (KID_{50}/ml_A), so erhält man den Wert p(t) in %:

$$p(t) = \frac{KID_{50}/ml_{P(t)}}{KID_{50}/ml_A} \cdot 100\ \%.$$

p(t) stellt somit das momentane Verhältnis des Virusgehalts des Perfusats unmittelbar nach der Organpassage zum konstanten Virusgehalt des Mediums vor der Organpassage (offenes System) dar.
Dieser Wert wurde für die Erstellung von Kurven, die den Verlauf der Clearance gegenüber den vier Virusarten veranschaulichen, herangezogen.
Mit ihm kann auch der temporäre Clearancewert $w_{Cl}(t)$ wie folgt berechnet werden:

$$w_{Cl}(t) = 100 - p(t) \text{ in } \%.$$

Der temporäre Clearancewert $w_{Cl}(t)$ gibt an, welcher Prozentsatz des infektiösen Virusgehalts einer zugeführten Volumeneinheit des Ausgangsperfusats zum Zeitpunkt t im Efflux nicht mehr wiedergefunden wurde.

3.2.6. Bestimmung der Virusinaktivierung durch die Leber

Aus dem Virusgehalt der Lebersuspension (vgl. 3.2.3.3.)

kann die Anzahl N_L der in der gesamten Leber enthaltenen, infektiösen Viruseinheiten berechnet werden:

$$N_L = KID_{50}/ml_L \cdot V_L ,$$

mit KID_{50}/ml_L = Gehalt an infektiösem Virus pro ml Lebersuspension

V_L = Volumen der Lebersuspension

Die Anzahl N_I der während der Perfusion von der Leber inaktivierten Viruseinheiten ergibt sich aus der Differenz der infektiösen Viruseinheiten des Ausgangsperfusats ($N_A = KID_{50}/ml_A \cdot V$) und der in Efflux ($N_E = KID_{50}/ml_E \cdot V$) und Leber ($N_L$) reisolierten infektiösen Viruseinheiten:

$$N_I = N_A - N_E - N_L$$

Analog dem in 2.5.2.3. definierten Phagozytosewert W_{Ph} wird ein Inaktivierungswert W_I eingeführt:

$$W_I = \frac{N_I}{N_A} \cdot 100\ \% =$$

$$= \frac{(KID_{50}/ml_A - KID_{50}/ml_E) \cdot V - KID_{50}/ml_L \cdot V_L}{KID_{50}/ml_A \cdot V}$$

mit V = Volumen der Virussuspension

Dieser Inaktivierungswert gibt den Prozentsatz der von der Leber inaktivierten Viruseinheiten (N_I) bezüglich der im Ausgangsperfusat enthaltenen, infektiösen Viruseinheiten (N_A) an.

3.2.7. Immunofluoreszenz

Für den qualitativen Nachweis der Viren in der Leber wurde die Immunofluoreszenz von Lebergewebsproben herangezogen. Gewebsproben, die aus den Organen nach Beendigung der Perfusion stammen, wurden in flüssigem Stickstoff bei -196°C schockgefroren und bei -70°C gelagert.
Für die indirekte Immunofluoreszenz nach der Sandwich-Methode nach COONS (52) sind folgende Immunseren vom Huhn benutzt worden: Antiseren gegen

- Avipoxvirus,
- Newcastle-Disease-Virus,
- aviäres Reovirus und
- Säuger-Reovirus, Serotyp 1.

Als Konjugat fand Fluoreszeinisothiozyanat (F.I.T.C.)-konjugiertes Anti-Huhn-Immunglobulin G vom Kaninchen (Fa. Miles-Yeda Ltd. Revohot, Israel) Anwendung.

3.2.8. Elektronenoptische Untersuchungen an Lebergewebsproben

Unmittelbar nach der Perfusion mit Virus wurde die Leber 5 Minuten lang mit 1,5%igem Glutaraldehyd in 0,1 M Sörensenpuffer per Perfusion fixiert, dann mit einer Punktionskanüle Gewebezylinder ausgestanzt und diese mit 1,5%igem Glutaraldehyd (2 Stunden) sowie 2%iger gepufferter Osmiumtetroxydlösung (1 Stunde) nachfixiert. Darauf folgte die Entwässerung und Einbettung in DURCUPAN. Die vollständig polymerisierten Leberpräparatblöcke wurden nach dem Trimmen an einem Ultramikrotom (LKB-Ultrotom II) geschnitten, die Ultradünnschnitte auf befilmte Trägernetze aufgenommen und nach REYNOLDS (1963) mit Uranylazetat und Bleizitrat kontrastiert.

Die Musterung der Gewebeschnitte erfolgte an einem Transmissionselektronenmikroskop (Zeiss EM 10 C/R) bei 60000 V Beschleunigungsspannung. Die Fotoarbeiten hat das institutseigene Labor ausgeführt.

3.2.9. Behandlung der Versuchstiere zur Überprüfung einer Stimulierbarkeit der unspezifischen hepatischen Abwehr

3.2.9.1. Verwendete Präparate

- Zymosan^{R} (Fa. Sigma Chemical Company); es handelt sich bei dieser Substanz um einen Zellwandextrakt der Hefe Saccharomyces cerevisiae.
- PARAMUN 209/82 (Fa. Iffa Merieux GmbH); das Präparat ist zusammengesetzt aus 2 Teilen β-Propiolakton-inaktiviertem Newcastle-Disease-Virus HB_1 und einem Teil E.coli-Lysat unter Zusatz von 2% N-Azetyl-D-Glucosamin, 1% Gelatine, Saponin Quilles A (1mg/Dosis) und Spuren von Thiomersal.
- PIND-Orf, Charge 007; es handelt sich um einen Paramunitätsinducer, hergestellt auf der Basis von γ-bestrahltem Orf-Virus (= Parapoxvirus ovis). Das Virus wurde auf sekundären BEL (= bovine embryonale Lungenzellen) vermehrt und die Ernte (43. BEL-Kulturpassage) durch γ-Strahlen (1600 krad) inaktiviert. Nach Zugabe von 1% Gelatine und 1% Glucosamin erfolgte die Gefriertrocknung.

3.2.9.2. Behandlungsmodus und Einteilung der Versuchstiergruppen

Die keimfrei aufgezogenen Ratten wurden in 4 Versuchsgruppen mit je 3 Versuchstieren eingeteilt. Die Applikation der Präparate erfolgte dreimal in Abständen von ca. 24 h jeweils durch eine subkutane Injektion der Stimulantien, wobei die letzte Injektion 16-20 h vor dem Perfusionsversuch stattfand. Hierfür wurden die Versuchstiere in ein Laminarstromgerät verbracht und unter sterilen Kautelen vorbehandelt.

- Die Versuchsgruppe I blieb als Kontrollgruppe unbehandelt.
- Die Versuchsgruppe II erhielt das Immunstimulans Zymosan^{R} in einer Dosierung von je 5 mg/Tier (Injektionsmenge 1 ml).
- Die Versuchsgruppe III wurde mit dem Inducer "PARAMUN" vorbehandelt; es wurde je 1 ml der 1:2 verdünnten Gebrauchslösung injiziert.
- Der Versuchsgruppe IV wurde der Inducer "PIND-Orf" appliziert (jeweils 1 ml des original aufgelösten Lyophilisates).

3.3. Ergebnisse

3.3.1. Ergebnisse der Untersuchungen zur unspezifischen Abwehrfunktion der isoliert perfundierten Leber konventionell gehaltener Ratten gegenüber verschiedenen Virusarten

3.3.1.1. Clearancewerte

Die ermittelten Virusmengen der Endperfusatproben (KID_{50}/ml_E) aus Perfusionen mit konventionell gehaltenen Versuchstieren lagen stets unter dem Virusgehalt des Ausgangsperfusats (KID_{50}/ml_A).
Die Clearance-Ergebnisse einzelner Perfusionsversuche sind im Anhang (Tab. 8 bis 11) zusammengestellt.
Tab. 1 gibt hingegen den für die jeweilige Virusart berechneten Clearancewert W_{Cl} als Mittelwert aus n Perfusionen mit derselben Virusart an.
Es lag in allen Fällen eine Clearancekapazität der isoliert perfundierten Rattenleber gegenüber den verschiedenen Virusarten vor. Aus den Perfusionen mit Hühnerpockenvirus resultierte dabei ein Clearancewert von 78,72%. Für das Newcastle-Disease-Virus konnte eine hepatische Clearance von 57,83% ermittelt werden. Bei Perfusionen mit aviärem Reovirus wurden 47,86% der Ausgangsvirusmenge im Endperfusat nicht mehr wiedergefunden, während sich bei den Perfusionen mit dem Säuger-Reovirus als Vertreter des homologen Virustyps ein Clearancewert von 57,97% feststellen ließ.

Tab. 1 : Clearance-Ergebnisse nach extrakorporaler Perfusion von Rattenlebern mit den Virusarten HP-1, NDV, aviärem Reo-118 und Säuger-Reo-1

Perfusions-material		Reisolierter Virusgehalt im Endperfusat (%)+			Clearance-wert (%)+		
Organ-spender	Virus (n)	$\frac{KID_{50}/ml_E}{KID_{50}/ml_A}$	±	s	W_{Cl}	±	s
kv	HP-1 (n = 14)	21,27	±	11,9	78,72	±	11,9
	NDV (n = 2)	42,17	±	0	57,83	±	0
	Reo 118 (n = 6)	52,13	±	9,17	47,86	±	9,17
	Reo 1 (n = 6)	42,03	±	11,88	57,97	±	11,88

+ = Mittelwert aus n Perfusionen;
s = Standardabweichung;
kv= konventionelle Haltung;

3.3.1.2. Zeitlicher Verlauf der hepatischen Clearance

Für die Clearancekinetik wurden die Virusgehalte der Perfusatproben ($KID_{50}/ml_P(t)$), die man während der Perfusion in bestimmten Zeitabständen entnommen hatte, in Bezug zum Ausgangsvirusgehalt gesetzt ($KID_{50}/ml_P(t)$ / KID_{50}/ml_A = p(t)) und in log % in Abhängigkeit von der Zeit graphisch dargestellt.
In den nachfolgenden Diagrammen (Abb. 7 bis 10) und Tabellen (Tab. 2 bis 5) sind die Ergebnisse über den zeitlichen Verlauf der hepatischen Clearance konventionell gehaltener Ratten gegenüber den untersuchten Virusarten festgehalten. Die dort angegebenen Werte (p(t), $w_{Cl}(t)$) sind stets Mittelwerte aus n Perfusionen derselben Virusart. Die Resultate zum Clearanceverlauf der einzelnen Perfusionsversuche sind im Anhang (Tab. 12 bis 15) aufgeführt.

Für die Leberperfusionen mit dem HP-1-Virus gibt der Graph in Abb. 7 Aufschluß über den zeitlichen Verlauf der Clearance. Die reisolierten Virusgehalte der nach 20, 35 und 50 Minuten stellen sich auf einem Niveau von etwa 22% des Virusgehalts des Ausgangsperfusats ein, während der Wert p(t=5 min) mit 33% höher liegt (Tab. 2).
Der Graph für die hepatische Clearance bei Perfusionen mit Newcastle-Disease-Virus (Abb. 8) steigt von etwa 39% (p(t) = 5 min)) auf einen 15-Minuten-Wert von ca. 58% an und schwankt bis zum Perfusionsende um den Betrag von etwa 54% (Tab. 3).
Der Kurvenzug zur Clearancekinetik konventionell gehaltener Ratten bei Perfusion mit aviärem Reovirus 118 (Abb. 9) besitzt zwischen dem 5 Min.-(31%) und dem 20 Min.-Wert (ca. 43%) eine steigende Tendenz und stabilisiert sich bis zum Perfusionsende auf einen Wert p (t=50 Min) von ca. 47% (Tab. 4).
Aus den Perfusionen mit Säuger-Reovirus 1 resultieren die in Tab. 5 und Abb. 10 wiedergegebenen Verhältnisse. Die

Kurve zum Clearanceverlauf zeigt über die gesamte Perfusionsdauer eine fallende Tendenz von 40% p(t=5 Min) auf 26,67% p(t=50 Min).

Unter Berücksichtigung der titrationsbedingten Streubreite der Momentanwerte p(t) besitzen die isoliert perfundierten Rattenlebern gegenüber den untersuchten Virusarten eine annähernd konstante, virusspezifische Clearancekapazität über die Gesamtdauer der Perfusion hinweg.

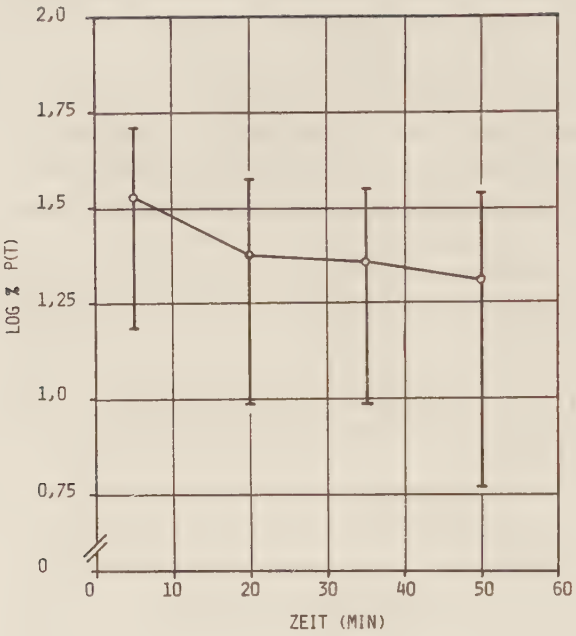


Abb. 7:

Clearanceverlauf aus Perfusionen der isolierten Rattenleber konventionell gehaltener Tiere mit HP-1-Virus (n = 14).

Tab. 2 : Ergebnisse zur Clearancekinetik aus Perfusionen der isolierten Rattenleber konventionell gehaltener Tiere mit HP-1-Virus (n = 14).

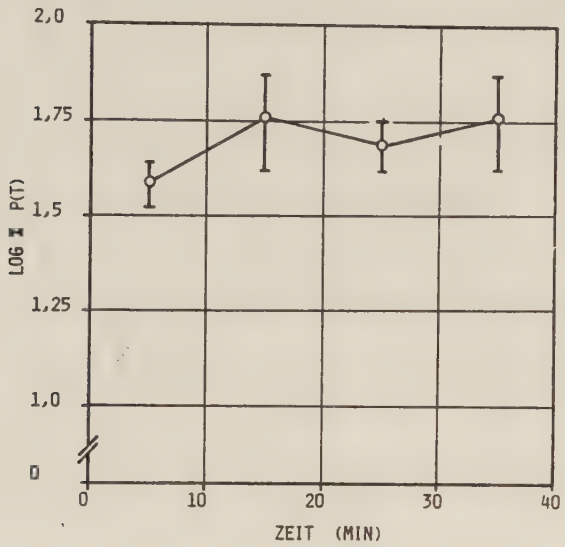
Zeitpunkt der Probenentnahme	Reisolierter Virusgehalt der Perfusatprobe P(t)		Temporärer Clearancewert
t (min)	p(t) ± s (%)$^+$	log p(t) (log %)$^+$	w_{Cl} ± s (%)$^+$
5	33,85 ± 18,25	1,53	66,15 ± 18,25
20	23,93 ± 13,99	1,38	76,07 ± 13,99
35	22,87 ± 13,11	1,36	77,13 ± 13,11
50	20,35 ± 14,46	1,31	79,65 ± 14,46

$$p(t) = \frac{KID_{50}/ml_{P(t)}}{KID_{50}/ml_{A}} \cdot 100\ \%$$

$^+$ = Mittelwert aus 14 Perfusionen

s = Standardabweichung

Abb. 8: Clearanceverlauf aus Perfusionen der isolierten Rattenleber konventionell gehaltener Tiere mit Newcastle-Disease-Virus (n = 2)



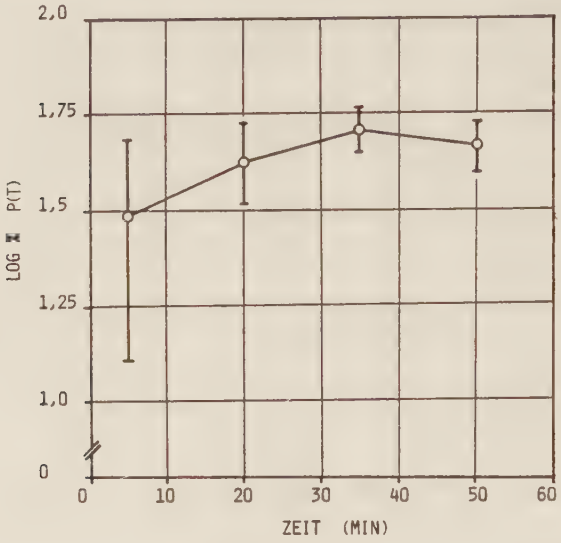
Tab. 3 : Ergebnisse zur Clearancekinetik aus Perfusionen der isolierten Rattenleber konventionell gehaltener Tiere mit Newcastle-Disease-Virus (n = 2).

Zeitpunkt der Probenentnahme	Reisolierter Virusgehalt der Perfusatprobe P (t)		Temporärer Clearancewert
t (min)	p(t) ± s (%)+	log p(t) (log %)+	w_{Cl} ± s (%)+
5	38,89 ± 5,27	1,59	61,11 ± 5,27
15	58,58 ± 16,41	1,76	41,42 ± 16,41
25	49,20 ± 7,03	1,69	50,80 ± 7,03
35	58,58 ± 16,41	1,76	41,42 ± 16,41

$$p(t) = \frac{KID_{50}/ml_{P}(t)}{KID_{50}/ml_{A}} \cdot 100\ \%$$

\+ = Mittelwert aus 2 Perfusionen
s = Standardabweichung

Abb. 9: Clearanceverlauf aus Perfusionen der isolierten Rattenleber konventionell gehaltener Tiere mit aviärem Reovirus 118 (n = 3)



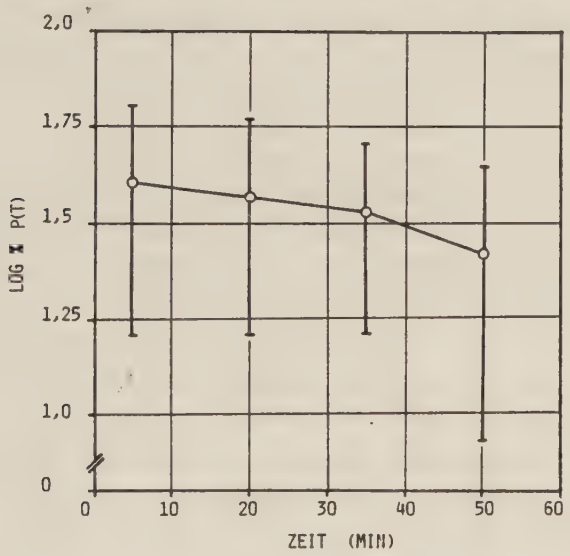
Tab. 4 : Ergebnisse zur Clearancekinetik aus Perfusionen der isolierten Rattenleber konventionell gehaltener Tiere mit aviärem Reovirus 118 (n = 3).

Zeitpunkt der Probenentnahme	Reisolierter Virusgehalt der Perfusatprobe P(t)		Temporärer Clearancewert
t (min)	p(t) ± s (%)$^+$	log p(t) (log %)$^+$	W_{Cl} ± s (%)$^+$
5	31,09 ± 18,27	1,49	68,91 ± 18,27
20	43,43 ± 10,08	1,63	56,57 ± 10,08
35	51,54 ± 6,63	1,71	48,46 ± 6,63
50	46,85 ± 6,63	1,67	53,15 ± 6,63

$$p(t) = \frac{KID_{50}/ml_P(t)}{KID_{50}/ml_A} \cdot 100\ \%$$

+ = Mittelwert aus 3 Perfusionen
s = Standardabweichung

Abb. 10: Clearanceverlauf aus Perfusionen der isolierten Rattenleber konventionell gehaltener Tiere mit Säuger-Reovirus 1 (n = 6)



Tab. 5 : Ergebnisse zur Clearancekinetik aus Perfusionen der isolierten Rattenleber konventionell gehaltener Tiere mit Säuger-Reovirus 1 (n = 6).

Zeitpunkt der Probenentnahme	Reisolierter Virusgehalt der Perfusatprobe P(t)		Temporärer Clearancewert
t (min)	p(t) ± s (%)$^+$	log p(t) (log %)$^+$	w_{Cl} ± s (%)$^+$
5	40,41 ± 24,13	1,61	59,59 ± 24,13
20	37,59 ± 21,59	1,57	62,41 ± 21,59
35	33,91 ± 17,50	1,53	66,09 ± 17,50
50	26,67 ± 18,13	1,42	73,33 ± 18,13

$$p(t) = \frac{KID_{50}/ml_{P}(t)}{KID_{50}/ml_{A}} \cdot 100\ \%$$

\+ = Mittelwert aus 6 Perfusionen
s = Standardabweichung

3.3.1.3. Inaktivierungswerte

Aus den reisolierten Virusgehalten des Endperfusats und der Lebersuspension der einzelnen Perfusionen wurde der Inaktivierungswert W_I bestimmt (vgl. 3.2.6.).

Er gibt den Prozentsatz der während der Perfusion der Leber zugeführten infektiösen Viruseinheiten an, der nach der Perfusion weder im Endperfusat noch in der Leber aufgefunden wurde und folglich als inaktiviert anzusehen ist.
Die Inaktivierungswerte einzelner Perfusionen sind dem Anhang (Tab. 16 bis 19) zu entnehmen.

In Tab. 6 sind die für die jeweilige Virusart berechneten Inaktivierungswerte W_I als Mittelwert aus n Perfusionen mit derselben Virusart dargestellt.

Bei Perfusionen von Rattenlebern konventionell gehaltener Versuchstiere mit HP-1-Virus wurden in Endperfusat und Leber etwa gleiche Prozentsätze (ca. 21%) an infektiösen Viruseinheiten wiederaufgefunden. Der Inaktivierungswert lag bei 58,28%.
Für die Leberperfusionen mit Newcastle-Disease-Virus wurde ein Inaktivierungswert von 50,6% bestimmt. Der Anteil reisolierter infektiöser Viruseinheiten im Endperfusat belief sich auf 42,2% und in der Leber auf 7,2%.
Aus den mit aviärem Reovirus 118 perfundierten Rattenlebern konnten 3,34% der insgesamt zugeführten infektiösen Viruseinheiten reisoliert werden; im Endperfusat wurden in diesem Fall 52,13% wiedergefunden. Der Inaktivierungswert betrug folglich für das aviäre Reovirus 44,26%.
Ein Inaktivierungswert von 41,9% ließ sich bei den Leberperfusionen mit dem homologen Säuger-Reovirus 1 errechnen, wobei im Endperfusat 42,03% und in der Leber 16,07 % der Ausgangsvirusmenge reisoliert werden konnten.

Tab. 6 : Zusammenstellung der Inaktivierungswerte von Rattenlebern bei extrakorporaler Perfusion mit den Virusarten HP-1, NDV, av. Reo-118 und Säuger-Reo-1

Perfusionsmaterial		Reisolierter Virusgehalt im Endperfusat	Reisolierter Virusgehalt in der Leber	Inaktivierungswert
Organspender	Virus (n)	$\frac{KID_{50}/ml_E}{KID_{50}/ml_A} \pm s$ (%)$^+$	$\frac{N_L}{N_A} \pm s$ (%)$^+$	$W_I \pm s$ (%)$^+$
kv	HP-1 (n = 14)	21,27 ± 11,90	20,53 ± 14,74	58,28 ± 20,56
	NDV (n = 2)	42,17 ± 0	7,22 ± 1,34	50,60 ± 1,34
	Reo 118 (n = 6)	52,13 ± 9,17	3,34 ± 1,37	44,26 ± 9,14
	Reo 1 (n = 6)	42,03 ± 11,88	16,07 ± 9,42	41,90 ± 10,04

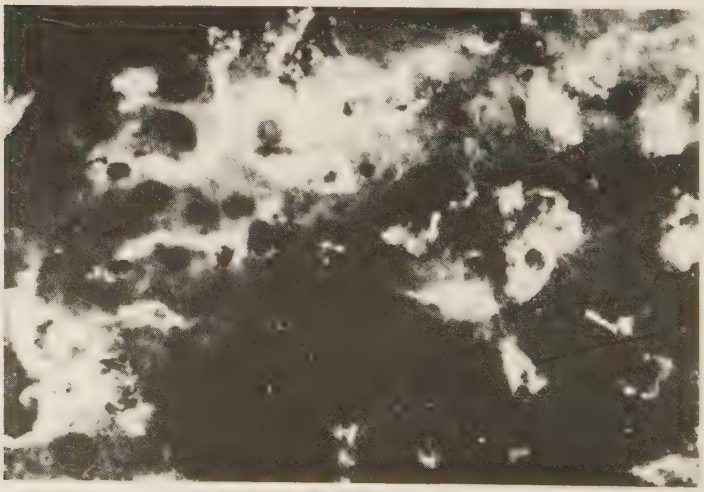
+ = Mittelwert aus n Perfusionen
s = Standardabweichung
kv = konventionelle Haltung

3.3.1.4. Immunofluoreszenz

Bei den Untersuchungen von Lebergewebsproben mittels indirekter Immunofluoreszenz konnte für alle vier Virusarten eine im Vergleich zu den Kontrollen spezifische Fluoreszenz im Bereich der Lebersinusoide festgestellt werden.

In Abb. 11 ist ein Gewebeschnitt aus einer mit aviärem Reovirus perfundierten Leber zu sehen. Man erkennt eine Fluoreszenz im Zytoplasma von Zellen, welche die Räume zwischen den Leberzellbalken auskleiden. Mit Hilfe des Fluoreszein-markierten Anti-Huhn-Immunglobulins, das sich an das Antiserum gegen aviäres Reovirus gebunden hat, wird die Bildung spezifischer Antigen-Antikörper-Komplexe zwischen dem im Zytoplasma der Sinusoidzellen befindlichen Virusantigen (av. Reo) und dem Antiserum indirekt nachgewiesen.

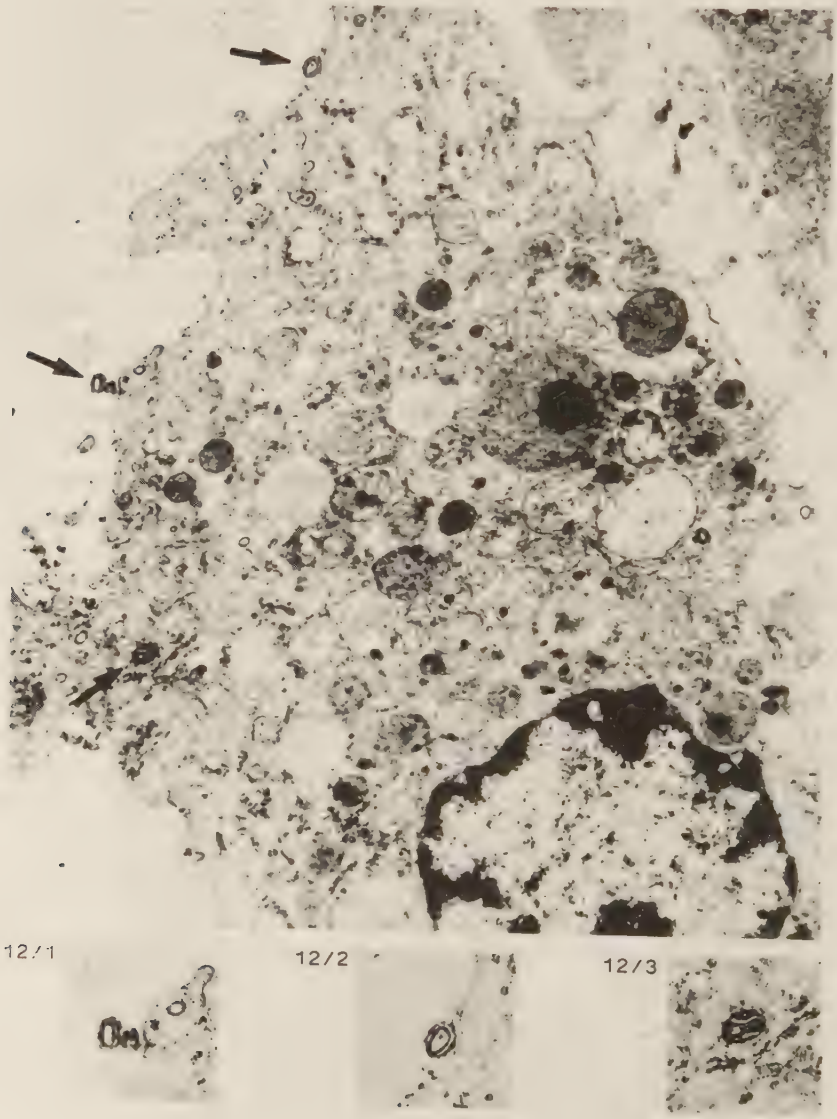
Abb. 11: Immunofluoreszenz-Aufnahme (400-fache Vergrößerung) eines Lebergewebspräparates aus einer Perfusion mit aviärem Reovirus 118 (Immunserum 1:8 verdünnt, Anti-Huhn-Konjugat-Verdünnung 1:16).



3.3.1.5. Elektronenoptische Untersuchung der Leber nach Perfusion mit HP-1-Virus

In Ultradünnschnitten von Rattenlebern, die mit Hühnerpockenvirus perfundiert worden waren, ließen sich typische Strukturen dünngeschnittener Pockenviren in den Lumina der Lebersinusoide nachweisen. Solche Formen wurden nicht im Disséschen Raum und in den Leberparenchymzellen gefunden. An den Endothelzellen, welche die Sinusoide begrenzen, waren Endozytosevorgänge mit HP-Partikeln nicht feststellbar. Dagegen scheint eine Interaktion der Lebermakrophagen mit den Pockenpartikeln gegeben. Es konnten verschiedene Stadien dieser Interaktion bei den Kupfferschen Sternzellen nachgewiesen werden.
In Abb. 12 ist eine KC im Dünnschnitt wiedergegeben, die mit HP-Partikeln aus dem Sinusoidlumen Membrankontakt aufgenommen hat (Abb. 12/2: Phase der Adsorption; Abb. 12/1: beginnende Invagination). Die typischen Strukturen eines Pockenvirus sind auch in einer Phagozytose-Vakuole (= Phagosom) dieser KC zu erkennen (Abb. 12/3: abgeschlossene Ingestion).
In Abb. 13 ist eine KC dargestellt, in deren Zytoplasma mehrere in einem Phagosom inkorporierte Hühnerpockenviren liegen.
Während in Abb. 12/3 das geschnittene Pockenpartikel eine relativ scharfe Konturierung der Innenstruktur besitzt, wird sie in den Abb. 14 und 15 nicht mehr so deutlich. Es handelt sich hierbei wahrscheinlich um einen beginnenden Abbau der Viren in den Phagozytose-Vakuolen.

Abb. 12: Ultradünnschnitt durch eine Kupfferzelle (KC);
Gesamtvergrößerung 1:20000 bzw. 1:32000.
12/1 und 12/2: HP-1-Viruspartikel in Adsorption
12/3: HP-1-Viruspartikel in einem Phagosom



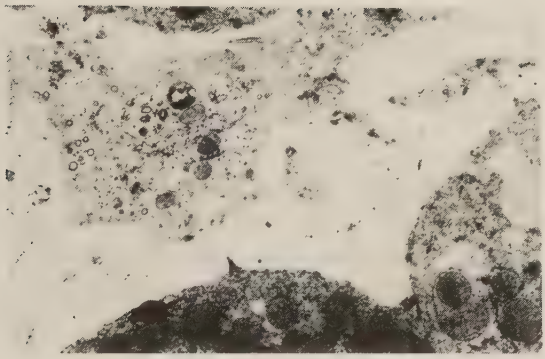


Abb. 13:
Ultradünnschnitt durch eine KC mit einer Phagozytosevakuole mit 4 Viruspartikeln
Gesamtvergr.: 1:10000

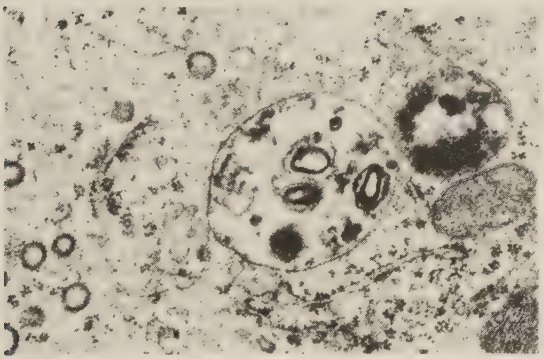


Abb. 14:
Phagozytosevakuole aus Abb. 13
(Phase der Ingestion)
Gesamtvergr.: 1:40000

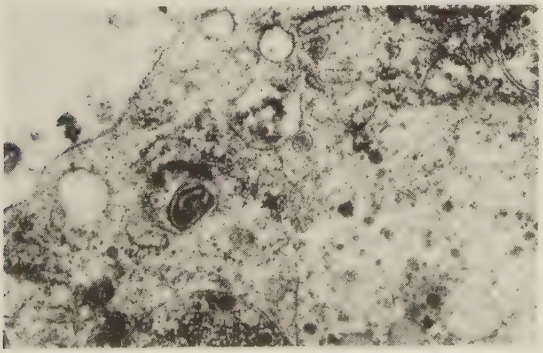


Abb. 15:
Phagosom in einer KC mit HP-1-Viruspartikel
(beginnende Abbauphase)
Gesamtvergr.: 1:40000

3.3.2. Ergebnisse der Versuche zur Stimulierbarkeit der unspezifischen Virusabwehr der Leber keimfrei aufgezogener Ratten

Zur Überprüfung einer Stimulierbarkeit der hepatischen Virusabwehr wurden der jeweilige Clearance- und Inaktivierungswert der Versuchsgruppen II bis IV (vorbehandelte Leberspender) den entsprechenden Werten der Kontrollgruppe I (unbehandelte Leberspender) gegenübergestellt.

3.3.2.1. Clearancewerte

Für die Kontrollgruppe I konnte ein relativ hoher Clearancewert von 91,46% ermittelt werden.
Die mit dem Immunstimulans Zymosan^{R} vorbehandelte Versuchsgruppe II besaß mit einem Clearancewert von durchschnittlich 85,56% eine etwas geringere Clearancekapazität als die Kontrollgruppe.
Bei den Perfusionsversuchen mit Lebern "PARAMUN"-behandelter Versuchstiere (Gruppe III) ließ sich ein Anteil von 89,34% der Ausgangsvirusmenge nachweisen, der von der Leber aus dem Perfusionsstrom entfernt worden war.
Für die mit dem Inducer "PIND-Orf" vorbehandelte Versuchsgruppe (IV) wurde ein Clearancewert von 92,85% ermittelt.
Die Clearancewerte der Versuchsgruppen III und IV kommen jenem der Kontrollgruppe etwa gleich.

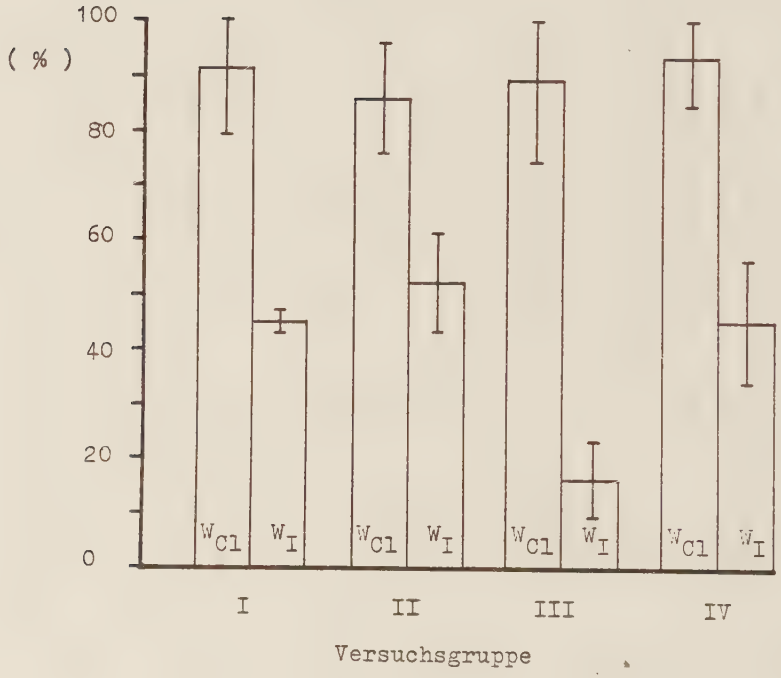
In Tab. 7 sind die gemittelten Clearancewerte für die verschiedenen Versuchsgruppen aufgeführt; außerdem werden diese Werte in Abb. 16 veranschaulicht.
Die Clearancewerte der einzelnen Perfusionen der vier Versuchsgruppen sind im Anhang in Tab. 20 wiedergegeben.
Der Vergleich der Clearancewerte zwischen den Versuchsgruppen II mit IV und der Kontrollgruppe zeigt auf, daß die Vorbehandlung der Leberspender mit den verschiedenen Präparaten

Tab. 7 : Clearance- und Inaktivierungswerte nach Vorbehandlung mit unterschiedlichen Präparaten bei keimfrei aufgezogenen Ratten (Perfusion mit HP-1-Virus)

Versuchsgruppe (n = 3)	Clearancewert $W_{Cl} \pm s$	Reisolierter Virusgehalt im Endperfusat $\overline{KID_{50}/ml_E} \pm s$	Reisolierter Virusgehalt in der Leber $\overline{N_L} \pm s$	Inaktivierungswert $W_I \pm s$
	(%)+	(%)+	(%)+	(%)+
I (=Kontrolle)	91,46 ± 11,85	8,77 ± 11,85	46,62 ± 12,23	44,83 ± 1,76
II (=Zymosan^R)	85,56 ± 10,06	14,43 ± 10,06	33,28 ± 10,66	52,25 ± 9,15
III (=PARAMUN)	89,34 ± 14,83	10,66 ± 14,83	72,95 ± 13,57	16,38 ± 6,99
IV (=PIND-Orf)	92,85 ± 8,90	7,14 ± 8,90	47,93 ± 12,59	45,46 ± 10,76

s = Standardabweichung
+ = Mittelwert aus 3 Perfusionen

Abb. 16: Clearance- (W_{Cl}) und Inaktivierungswert (W_I) der Versuchsgruppen I bis IV nach Perfusion der Leber keimfrei aufgezogener Ratten mit HP-1-Virus (Mittelwerte aus jeweils 3 Perfusionen).



keine wesentliche Steigerung der hepatischen Clearancekapazität gegegenüber HP-1-Viren bewirkte. Die Clearancewerte sämtlicher Versuchsgruppen lagen annähernd gleich hoch bei ca. 90%.

3.3.2.2. Inaktivierungswerte

Die für die Versuchsgruppen I bis IV ermittelten Inaktivierungswerte sind in Tab. 7 als gemittelte Werte aufgeführt und ebenso in Abb. 16 graphisch dargestellt.
Die Inaktivierungswerte der einzelnen Perfusionen der vier Versuchsgruppen sind im Anhang in Tab. 20 zusammengefaßt.
Bei den Leberperfusionen der Kontrollgruppe I konnten 8,7% der Ausgangsvirusmenge im Endperfusat und 46,6% in der Leber reisoliert werden; der Inaktivierungswert der Versuchsgruppe I betrug daher 44,8%.
Für die Versuchsgruppe II (Applikation von Zymosan^R) wurde ein Inaktivierungswert von 52,28% ermittelt. Die Vorbehandlung der Leberspender mit Zymosan^R bewirkte somit ein im Vergleich zur Kontrollgruppe geringgradig verbessertes hepatisches Inaktivierungsvermögen. Dabei wurde gegenüber den Kontrollen ein etwas höherer Gehalt an infektiösem Virus im Efflux (14,4%), allerdings mit 33,2% ein deutlich niedrigerer Prozentsatz in der Leber aufgefunden.
Die Versuchsgruppe IV (Vorbehandlung mit "PIND-Orf") unterschied sich in der hepatischen Inaktivierungsfähigkeit (W_I = 45,46%) kaum von der Kontrollgruppe, wobei mit etwa 7% im Efflux und 47,4% in der Leber eine ähnliche Verteilung der reisolierten Viruseinheiten wie bei der Kontrollgruppe vorlag.
Im Gegensatz zu den anderen Versuchsgruppen war bei den mit "PARAMUN" behandelten Ratten eine im Vergleich zu den Kontrollen wesentlich verringerte Fähigkeit der Leber zur Virusinaktivierung (W_I = 16,38%) festzustellen. Es konnte ein

hoher Anteil infektiöser Viruseinheiten in der Leber gefunden werden (72,95%), während im Efflux wie bei den anderen Versuchsgruppen etwa 10% nachweisbar waren.
Durch die Vorbehandlung der Leberspender mit den verschiedenen Präparaten wurde somit auch keine deutliche Steigerung der hepatischen Inaktivierungsfähigkeit gegenüber HP-1-Viren erreicht. Lediglich bei mit Zymosan^{R} behandelten Ratten lag eine geringfügige Erhöhung der Inaktivierungskapazität vor; die Applikation von "PARAMUN" zog sogar eine Abnahme der hepatischen Virusinaktivierung bei den Leberspendern(Versuchsgruppe III) nach sich.

4. Besprechung der Ergebnisse

Bei den Untersuchungen zur Abwehrfunktion der Leber gegenüber verschiedenen Bakterien und der Hefe Candida albicans mit Hilfe des Versuchsmodells der Leberperfusion klärte man bisher vorrangig den Einfluß humoraler Komponenten im Zusammenwirken mit zellulären Elementen auf Clearance und Phagozytose der Leber ab. Nur in wenigen Experimenten befaßte man sich auch mit der rein zellgebundenen Abwehrfähigkeit der Leber. So konnte einerseits ein hohes hepatisches Clearancevermögen festgestellt werden, ohne daß unspezifische wie spezifische Serumbestandteile dem Perfusionsmedium beigesetzt waren (4, 56, 65, 85, 86). Ein Inaktivierungsvermögen war entweder nicht nachweisbar (4, 65, 86) oder lag bei Werten um 20% der Ausgangsinfektiosität (56, 85).

Aus Versuchen zur Clearance i.v.-verabreichter Viren läßt sich schließen, daß neben anderen Körpermakrophagen die Kupffer'schen Sternzellen maßgeblich an der Blutclearance von Viren beteiligt sind (19, 62, 95). Bei Applikation von heterologem und nichtpathogenem Virus folgte der Aufnahme auch der Abbau des Virusmaterials durch die Makrophagen (19, 62). Nach den wenigen Literaturangaben scheint die Virusclearance auf einer unspezifischen Reaktion der Makrophagen zu beruhen, während eine Inaktivierung von virusspezifischen Abwehrkomponenten abhängen dürfte (45).

In der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe der Leberperfusionsmethode das hepatische Clearance- und Inaktivierungsvermögen gegenüber Virus überprüft, wobei allein die Bedeutung der unspezifischen zellgebundenen Abwehrmechanismen interessierte.

Bei den für die Virusclearance und -inaktivierung verantwortlichen Faktoren handelte es sich ausschließlich um sofort wirkende Abwehrmechanismen. Eine Beteiligung von Interferon als unspezifisches antivirales Prinzip ist unwahrschein-

lich, da seine Bildung erst auf eine Induktion hin erfolgt. Spezifische (Antikörper) wie unspezifische (Serumfaktoren) humorale Komponenten wurden durch die gewählten Perfusionsbedingungen (Vorperfusion, Perfusionsmedium ohne Zusatz von Blutbestandteilen) sowie durch die überwiegende Verwendung heterologer Virusarten ausgeschlossen.
Als maßgebliches Wirkungsprinzip für die ermittelte zellgebundene Abwehrfunktion der Leber wird die Phagozytose der Viren durch die Kupffer'schen Sternzellen diskutiert. Ferner ist die Möglichkeit nicht auszuschließen, daß die Lebermakrophagen unmittelbar Substanzen abgeben, welche auf die perfundierten Viren inaktivierend wirken. Die KC der Leber sind bekannte Produktionsstätten für Komplementproteine, insbesondere der C3-Komponente und von Bestandteilen des alternativen Aktivierungsweges (3, 58, 99). Desweiteren wären lysosomale Enzyme oder Lysozym als direkt virostatisch bzw. viruzid wirkende Produkte der KC denkbar.
Schwerpunktmäßig sollte die Arbeit Aussagen über eine unspezifische hepatische Abwehrfunktion gegenüber Viren ermöglichen. Die Bedeutung der Phagozytose durch die KC stand dabei im Mittelpunkt. Bedacht werden mußte, daß die KC durch den Antigenkontakt in ihrer Phagozytosefähigkeit erregerunspezifisch stimuliert werden können (sog. aktivierte Makrophagen). Desweiteren sind die KC durch die Fähigkeit, Komplementproteine zu synthetisieren und zu sezernieren, von opsonisierenden Blutbestandteilen unabhängig. Durch eine Opsonisierung der Viruspartikel mit Komplement kann es somit zu einer unspezifischen Steigerung der Phagozytose-Effizienz kommen.

Unter den gewählten Versuchsbedingungen ließ sich eine deutliche unspezifische Clearancekapazität der Leber konventionell gehaltener Ratten nachweisen. Dies stimmt mit den Ergebnissen aus Leberperfusionen mit Bakterien und Pilzen und den Resultaten zur Blutclearance von Viruspartikel überein.

Bei den komplex aufgebauten, bis 300 nm großen Hühnerpokkenviren wurde das höchste Clearancevermögen bezogen auf den

Ausgangsvirusgehalt festgestellt (W_{Cl} = 78,7%), 58% der Ausgangsvirusmenge des behüllten, im Durchmesser etwa 100 nm großen Newcastle-Disease-Virus waren im Endperfusat nicht wiederauffindbar, während sich für das nackte, 60 bis 80 nm große Reovirus ein Clearancewert von 48% (aviäres) bzw. 58% (Säuger-) einstellte.
Der Unterschied zwischen der Clearancefähigkeit der Leber konventionell gehaltener Ratten gegenüber dem heterologen und gegenüber dem homologen Reovirus beruht wahrscheinlich nicht auf einer differierenden unspezifischen Clearancekapazität der Leber gegenüber dem aviären bzw. Säuger-Reovirus. Ein Grund für die unterschiedlichen Clearancewerte könnte zum einen in der höheren Ausgangsvirusmenge bei den Versuchen mit aviärem Reovirus liegen. Andererseits ist bei den Perfusionen mit dem homologen Reovirus nicht auszuschließen, daß der hepatische Clearancewert durch einen möglichen Vorkontakt der Leberspender mit dem Virus beeinflußt wurde. Für diese Ursache spricht auch die starke Streuung der Clearancewerte bei den einzelnen Perfusionen mit dem Säuger-Reovirus. Als Mechanismus dieser variierenden hepatischen Clearancefähigkeit der einzelnen Leberspender gegenüber dem homologen Virustyp ist die unterschiedliche Ausbildung zellmembranständiger Antikörper an den KC (= sog. armierter Makrophage (58)) infolge des differierenden Vorkontaktes mit dem Säuger-Reovirus denkbar.

Wie die Ergebnisse zur Clearancekinetik belegen, bleibt die unspezifische Clearancefähigkeit der Leber gegenüber den perfundierten Virusarten über die gesamte Perfusionsdauer annähernd konstant. Eine aufgrund des gleichbleibend hohen Virusangebots (offenes System) möglicherweise eintretende Sättigung und ein damit verbundener Abfall des Clearancevermögens war nicht festzustellen. Die ermittelten temporären Clearancewerte $W_{Cl}(t)$ stimmen unter Berücksichtigung der titrationsbedingten Variationsbreite der Einzelergebnisse mit dem aus dem Endperfusat bestimmten Clearancewert W_{Cl} in etwa überein. Folglich tritt bis zur Beendigung der

Perfusion auch keine Infektiositätsminderung der Viren im Reservoir R_2 auf. Die Clearance beruht vielmehr auf einer direkten Interaktion der Viren mit den Lebersinusoiden während der Passage.
Bei den Graphen zur Clearancekinetik der Leberperfusionen mit den 4 verschiedenen Virusarten fällt vor allem die Abweichung des 5-Minuten-Wertes auf.
Bei den Perfusionen mit Hühnerpockenvirus bzw. mit Säuger-Reovirus liegt der temporäre Clearancewert zu Zeit t = 5 Min. niedriger als die weiteren Zeitwerte. Dies könnte auf eine nach diesem Zeitraum eintretende unspezifische Stimulierung der Lebermakrophagen durch den Virusantigenkontakt hinweisen.

Der Kurvenzug zum Clearanceverlauf der Perfusionen mit Newcastle-Disease-Virus könnte so interpretiert werden, daß der 5 Min.-Wert wie auch die weiteren temporären Clearancewerte zum einen titrationsbedingt, zum anderen aufgrund der geringen Anzahl durchgeführter Perfusionen um den aus dem Endperfusat errechneten Clearancewert schwankt.
Der Graph zum Clearanceverlauf der Leberperfusionen mit aviärem Reovirus läßt die Tendenz einer fallenden hepatischen Clearancefähigkeit erkennen. Der 5 Min.-Wert spricht für eine anfänglich höhere Clearancekapazität, die sich aber nach 20-minütiger Virusperfusion aufgrund des großen Virusangebots auf Werte um 50% einstellt.

Die mit Hilfe der Perfusionsversuche ermittelte Inaktivierungsfähigkeit der Leber gegenüber den 4 verwendeten Virusarten ist mit 58% (HP-1-Virus) bis 42% (Säuger-Reovirus) der jeweiligen Ausgangsvirusgehalte als erhebliche unspezifische Abwehrleistung zu beurteilen.

Der qualitative Virusnachweis in den Zellen der Lebersinusoide mittels Immunofluoreszenz, der für alle perfundierten Virusspezies geführt wurde, bestätigt die Annahme, daß für die ermittelte Viruscleärance und -inaktivierung Vorgänge zwischen den Viren und den Sinusoidzellen verantwortlich sind, die mit der Anlagerung an die Sinusoidzellen und der Aufnahme des Virusantigens in die Sinusoidzellen und somit

mit Phagozytosevorgängen seitens der Kupfferzellen einhergehen.

Mit Hilfe der elektronenoptischen Untersuchung von Lebergewebsproben nach Perfusion mit Hühnerpockenvirus konnte bewiesen werden, daß die ermittelte hepatische Abwehrfunktion auf einer Interaktion der Kupffer'schen Sternzellen mit den HP-1-Viren beruht, wobei Stadien der Adsorption und Ingestion von HP-1-Viren festgehalten wurden. Somit ist es wahrscheinlich, daß die mit der Leberpassage einhergehende Reduktion der Ausgangsvirussuspension auf Phagozytoseaktivitäten der KC zurückzuführen ist.
Die Aufnahme von Viren in Phagosomen im Zusammenhang mit dem anschließenden Virusabbau konnte auch für das Influenza-, das Vaccinia- und das Ektromelievirus belegt werden (23).
Das Auftreten von Phagosomen, die ein oder mehrere Viruspartikel enthalten, wurde bei der Virusclearance durch Makrophagen beschrieben (92, 95) wie auch die Bedeutung der Phagozytose durch die KC bei der Blutclearance von nichtpathogenen Viren bekräftigt (62, 95).
Der Möglichkeit, daß der elektronenoptische Befund der Viruspartikel-Inkorporation in die Lebermakrophagen den beginnenden "Uncoating-Prozeß" für eine nachfolgende Virusvermehrung darstellt, ist entgegenzuhalten, daß bei den Perfusionsversuchen heterologes Virus benutzt wurde, das sich in Säugerzellen nicht vermehrt. Es wird aufgenommen und abgebaut.

Folglich wird, unterstütztdurch die Resultate aus den Immunofluoreszenz-Untersuchung, davon ausgegangen, daß die für HP-1-Virus bestätigten Phagozytosevorgänge durch die Kupfferzellen für die hepatische Clearance und Inaktivierung bei allen verwendeten Virusarten eine große Bedeutung als unspezifischer Abwehrmechanismus gegen Viren besitzen.

Weiterführenden Arbeiten bleibt es vorbehalten, neben einer Annäherung der Perfusionsbedingungen an in vivo-Verhält-

nisse und einer Quantifizierung der Virusabwehr der isoliert perfundierten Leber auch Fragen der Beeinflussung der hepatischen Virusabwehr durch humorale Faktoren abzuklären.

Für die Versuche zur Stimulierbarkeit der unspezifischen Virusabwehr in der Leber dienten keimfrei aufgezogene Ratten als Leberspender, da man bei diesen Tieren von einem einheitlichen, durch Keimkontakt nicht beeinflußten Abwehrstatus ausgehen kann. Weiterhin waren hierdurch mögliche synergistische oder antagonistische Wechselwirkungen verschiedener Mikroorganismen ausgeschlossen, sodaß gezielt die unspezifische hepatische Abwehrfunktion gegenüber der perfundierten Virusart (HP-1-Virus) überprüft werden konnte.

Das als Immunstimulans bezeichnete Zymosan^{R} wurde eingesetzt, weil in verschiedenen Untersuchungen eine Aktivierung des retikuloendothelialen Systems nachweisbar war, die insbesondere zu einer Hypertrophie der Leber und zu einem zahlenmäßigen Anstieg der Lebermakrophagen führte (25, 81, 91).

Das auf einer Kombination von viraler (inaktiviertes NDV) und bakterieller (E. coli-Lysat) Komponente sowie Saponin beruhende PARAMUN befindet sich als Paramunitätsinducer in der Phase der infektionsmedizinischen Wirksamkeitsprüfung.
Der biologische Inducer PIND-Orf hat sich in Infektionsmodellen bei Babymäusen (mit dem Virus der Vesikulären Stomatitis) bzw. bei Adultmäusen (mit Aujeszky-Virus) und in weiteren klinischen Versuchen als Paramunitätsinducer bewährt (14, 15, 53, 54, 68, 77).

Das vorliegende Versuchsmodell war so ausgelegt, daß insbesondere die Kupfferschen Sternzellen als unspezifische Abwehrkomponente gegen das perfundierte heterologe HP-1-Virus wirksam werden konnten. Es wurde also überprüft, ob die mit einer dreimaligen s.c.-Injektion angestrebte paraspezifische Abwehrsteigerung auch zu einer Erhöhung der Abwehrleistung der Lebermakrophagen führte.

Im Vergleich zur Kontrollgruppe (I) ließ sich keine deutliche Stimulierung der unspezifischen hepatischen Virusabwehr - insbesondere der Virusphagozytose durch die KC - bei den vorbehandelten Versuchsgruppen (II bis IV) nachweisen.
Bei den mit Zymosan^{R} vorbehandelten Versuchstieren lag der Anteil an der Ausgangsvirusmenge, der während der Perfusion von der Leber aus dem Perfusatstrom entfernt wurde, um knapp 6% niedriger als bei den Kontrolltieren, während der Inaktivierungswert um 7,4% höher lag. Dabei war im Gegensatz zu den Werten der Kontrollperfusionen (46,6%) der in der Leber reisolierte Virusgehalt mit 33,3% deutlich geringer. Dies weist auf einen gewissen aktivierenden Effekt des Zymosans^{R} auf die Lebermakrophagen hin, der aufgrund der geringen Anzahl der Perfusionsversuche allerdings nicht statistisch ausgewertet wurde. Die erkennbare Tendenz einer Aktivierung der unspezifischen Inaktivierungsfähigkeit der Leber gegenüber Virus müßte in fortführenden Arbeiten verfolgt werden.
Das Ausbleiben einer manifesten Stimulierung der hepatischen Abwehr deckt sich mit Ergebnissen aus Leberperfusionen mit der Hefe Candida albicans. Der nach Glucan (= Polysaccharidkomponente aus Zymosan)-Vorbehandlung festgestellte massive Influx von Monozyten in der Leber bewirkte keine unmittelbare Erhöhung der Makrophagenaktivität der Leber, sondern war nur bei Anwesenheit von Serumopsoninen mit einer Steigerung der Phagozytosefähigkeit der Leber verbunden (88).

Ähnlich ist das Fehlen einer merklichen Aktivierung der unspezifischen hepatischen Abwehrfunktion nach Applikation von PIND-Orf erklärbar. PIND-Orf zählt zu den multipotenten biologischen Inducern (53), deren paraspezifische stimulierende Wirkung offensichtlich auf das Zusammenspiel humoraler und zellulärer Abwehrkomponenten angewiesen ist. So wurde z.B. bei Leberperfusionen mit der Bakterienspezies Pseudomonas aeruginosa als Testkeim ein phagozytose-

fördernder Effekt von PIND-AVI (biologischer Inducer auf der Basis von γ-strahleninaktiviertem Hühnerpockenvirus) bei keimfrei aufgezogenen Ratten festgestellt, der aber überwiegend auf der Stimulierung opsonisierender Faktoren beruhte (57).

Die auffällige Verschlechterung des hepatischen Inaktivierungsvermögens keimfrei aufgezogener Ratten, die mit PARAMUN vorbehandelt worden waren, könnte in dem Zusatz von Saponin zu diesem Inducer begründet sein. Denn Saponine besitzen einen erheblichen allgemeinen Reizeffekt, wirken als Protoplasmagifte, wenn sie in relativ hohen Dosen verabreicht werden, und beeinträchtigen die Membranstabilität (z.B. Hämolyse, Gefäßpermeabilitätsstörungen). Interessanterweise ist die hepatische Clearancekapazität davon nicht betroffen, während die maßgeblich auf der Phagozytose durch die Lebermakrophagen beruhende Virusinaktivierung stark verringert ist.

Es bleibt weiterführenden Arbeiten überlassen, die festgestellten Unterschiede bei der Beeinflussung der Abwehrfähigkeit der isoliert perfundierten Rattenleber keimfrei aufgezogener Versuchstiere in ihrer Tendenz zu bestätigen und durch eine größere Anzahl von Leberperfusionsversuchen quantitativ abzusichern.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die unspezifische Abwehrfähigkeit der Leber gegenüber Viren an der isoliert perfundierten Rattenleber untersucht und durch die Parameter Virusclearance und -inaktivierung charakterisiert.
Als Modellviren dienten heterologe Virusarten, wobei neben dem komplex aufgebauten Hühnerpockenvirus (200x300nm) und dem behüllten Newcastle-Disease-Virus (ø 100nm; Paramyxovirus) auch das nackte aviäre Reovirus (ø 60-80nm) verwendet wurden, und als Vertreter des homologen Virustyps das Säuger-Reovirus (nackt; ø 60-80nm).
Die hepatische Virusclearance besaß ein Ausmaß von durchschnittlich fast 80% (beim Avipoxvirus) bis etwa 48% (beim aviären Reovirus) der infektiösen Ausgangsvirusmenge.
Im Verlauf der Perfusion wurden im Mittel zwischen 58% (beim Avipoxvirus) und ungefähr 42% (beim Säuger-Reovirus) der jeweils zugeführten infektiösen Viruseinheiten inaktiviert.
Der qualitative Virusnachweis in den Lebersinusoidzellen mittels Immunofluoreszenz bestätigte die Aufnahme von Virusantigen in die Sinusoidzellen als Grundlage der ermittelten hepatischen Clearance- und Inaktivierungsfunktion gegenüber allen benutzten Virusarten.
Anhand der elektronenoptischen Untersuchungen von Gewebsproben der perfundierten Leber wurde die Phagozytose durch die Kupffer'schen Sternzellen als unspezifischer hepatischer Abwehrmechanismus gegen Viren (am Beispiel des Avipoxvirus) bewiesen.
Neben der Virusphagozytose kommen unmittelbar viruzid bzw. virostatisch wirkende Produkte der Lebermakrophagen (z.B. Komplementproteine) als weiteres unspezifisches Virusabwehrprinzip in Frage, dessen Anteil an der festgestellten hepatischen Clearance- und Inaktivierungsfähigkeit allerdings nicht abgeklärt wurde.

Im Literaturteil wurden die Wirtsmechanismen der unspezifischen Virusabwehr kritisch besprochen; desweiteren sind die Grundlagen der Leberperfusion erarbeitet und ihre Anwendungsmöglichkeiten aufgezeigt worden.

Summary

Experimental investigations on the nonspecific hepatic defense against various viruses by means of the isolated perfused rat liver

The objective of the study was to investigate the nonspecific defense of the liver against viruses using the isolated perfused rat liver as test model. Parameters employed were 'virus clearance' and 'virus inactivation'.
The following heterologous virus species served as test viruses: the complex particle of avipoxvirus (200 x 300nm), the enveloped Newcastle-Disease virus (ø 100nm; paramyxovirus) and the naked avian reovirus (ø 60-80nm). Mammalian reovirus served as a representative for the homologous virus type.
The hepatic virus clearance averaged approximately 80% in the avipoxvirus model and about 48% in the avian reovirus model.

An average of approximately 58% and 42% of infectious viral units of avipoxvirus and mammalian reovirus respectively passing through the liver were inactivated.
The demonstration of virus antigen in liver sinusoidal cells by means of immunofluorescence confirmed that the uptake of viral antigen into the sinusoidal cells is the basis for hepatic clearance and inactivation for all virus species used.
Electron microscopic examination of tissue specimens of the perfused liver revealed that phagocytosis by Kupffer cells represent a nonspecific hepatic defense mechanism against viruses as exemplified for the avian poxvirus.

In addition to the phagocytosis of virus particles the direct effect of virucid of virostatic substances produced by liver macrophages (e.g. complement proteins) may be

another nonspecific defense principle against viruses. Its role in hepatic clearance and inactivation ability, however, has not been determined.

In the literature chapter the host mechanisms of the nonspecific virus defense are reviewed; furthermore, the basis of liver perfusion and its possible applications were presented.

6. Anhang

Im Anhang sind die Ergebnisse zur hepatischen Virusclearance (Tab. 8 bis 11), Clearancekinetik (Tab. 12 bis 15) und Virusinaktivierung (Tab. 16 bis 19) aus den einzelnen Leberperfusionen mit konventionell gehaltenen Ratten zusammengestellt.

Tab. 20 enthält die Clearance- und Inaktivierungswerte gegenüber HP-1-Virus, die für die einzelnen Leberperfusionen mit keimfrei aufgezogenen Ratten nach Vorbehandlung der Leberspender mit Zymosan^{R}, "PARAMUN" bzw. "PIND-Orf" ermittelt wurden.

Tabelle 8: Einzelergebnisse der Perfusionen mit MF-1-Virus (kv-Haltung)

Perfusion lfd. Nr. (-)	Virusgehalt des Ausgangsperfusats log KID_{50}/ml_A	Virusgehalt des Endperfusats log KID_{50}/ml_E	Perfusat-volumen V (ml)	Clearance-wert W_{Cl} (%)
1	7,1	6,35	240	82,22
2	7,1	6,1	240	90,0
3	7,1	6,1	240	90,0
4	7,1	5,6	265	96,83
5	7,6	6,85	240	82,22
6	7,35	6,6	240	82,22
7	7,1	6,35	240	82,22
8	7,1	6,1	240	90,0
9	7,1	6,35	240	82,22
10	7,35	6,6	240	82,22
11	7,35	6,725	235	76,28
12	7,1	6,725	240	57,83
13	7,35	6,975	240	57,83
14	7,35	6,975	240	57,83
Mittelwert der Clearancewerte $W_{Cl} \pm s = 78,72 \pm 11,9$ %				

Tabelle 9: Einzelergebnisse der Perfusionen mit Newcastle-Disease-Virus (kv-Haltung)

Perfusion lfd. Nr. (-)	Virusgehalt des Ausgangsperfusats log KID_{50}/ml_A	Virusgehalt des Endperfusats log KID_{50}/ml_E	Perfusat-volumen V (ml)	Clearance-wert W_{Cl} (%)
1	8,1	7,725	220	57,83
2	7,475	7,1	220	57,83
Mittelwert der Clearancewerte $W_{Cl} \pm s = 57,83 \pm 0$%				

Tabelle 10: Einzelergebnisse der Perfusionen mit aviärem Reovirus 118 (kv-Haltung)

Perfusion lfd. Nr. (-)	Virusgehalt des Ausgangsperfusats log KID_{50}/ml_A	Virusgehalt des Endperfusats log KID_{50}/ml_E	Perfusat-volumen V (ml)	Clearance-wert W_{Cl} (%)
1	8,6	8,35	245	43,76
2	8,6	8,35	245	43,76
3	8,35	8,1	240	43,76
4	8,6	8,1	190	68,37
5	8,6	8,35	240	43,76
6	8,35	8,1	240	43,76
Mittelwert der Clearancewerte $W_{Cl} \pm s = 47,86 \pm 9,17\%$				

Tabelle 11: Einzelergebnisse der Perfusionen mit Säuger-Reovirus, Serotyp 1 (kv-Haltung)

Perfusion lfd. Nr. (-)	Virusgehalt des Ausgangsperfusats log KID_{50}/ml_A	Virusgehalt des Endperfusats log KID_{50}/ml_A	Perfusat-volumen V (ml)	Clearance-wert W_{Cl} (%)
1	7,725	7,475	235	43,76
2	7,1	6,6	280	68,37
3	7,6	7,225	290	57,83
4	7,6	7,35	290	43,76
5	7,6	6,975	240	76,28
6	7,1	6,725	290	57,83
Mittelwert der Clearancewerte $W_{Cl} \pm s = 57,97 \pm 11,88\%$				

Tabelle 12: Einzelwerte zum Clearanceverlauf bei Perfusionen mit HP-1-Virus (kv-Haltung)

Zeitpunkt der Probenentnahme t (min)	Lfd. Perfusions-Nr.							p(t) ± s (%)+
	Reisolierter Virusgehalt der Perfusatproben einzelner Perfusionen zum Zeitpunkt t log $KID_{50}/ml_P(t)$							
	1	2	3	4	5	6	7	(n = 14)
5	6,35	6,975	6,85	6,6	6,1	6,65	6,6	
20	6,35	6,35	6,6	5,6	6,85	6,85	6,1	
35	6,35	6,35	6,6	6,1	6,85	6,6	6,35	
50	6,35	6,35	5,6	6,6	6,85	6,6	6,35	
	8	9	10	11	12	13	14	
5	6,6	6,6	7,225	7,1	6,35	6,35	6,725	33,85±18,25
20	6,1	6,35	6,725	6,85	6,725	6,85	7,1	23,93±13,99
35	6,1	6,1	6,85	6,725	6,475	7,1	6,975	22,87±13,11
50	6,1	5,85	6,35	6,85	6,725	6,475	7,1	20,35±14,46

$$p(t) = \frac{KID_{50}/ml_P(t)}{KID_{50}/ml_A} \cdot 100\%$$

s = Standardabweichung

+ = Mittelwert aus n Perfusionen

Tabelle 13: Einzelwerte zum Clearanceverlauf bei Perfusionen mit Newcastle-Disease-Virus (kv-Haltung)

Zeitpunkt der Probenentnahme t (min)	Lfd. Perfusions-Nr.		p(t) ± s (%)+
	Reisolierter Virusgehalt der Perfusatproben einzelner Perfusionen zum Zeitpunkt t log $KID_{50}/ml_P(t)$		
	1	2	(n = 2)
5	7,6	7,1	38,89 ± 5,27
15	7,725	7,35	58,58 ± 16,41
25	7,85	7,1	49,2 ± 7,03
35	7,975	7,1	58,17 ± 16,41

$$p(t) = \frac{KID_{50}/ml_P(t)}{KID_{50}/ml_A} \cdot 100\%$$

\+ = Mittelwert aus n Perfusionen

s = Standardabweichung

Tabelle 14: Einzelwerte zum Clearanceverlauf bei Perfusionen mit aviärem Reovirus 118 (kv-Haltung)

Zeitpunkt der Probenentnahme t (min)	Lfd. Perfusions-Nr.			p(t) ± s (%)+ (n = 3)
	Reisolierter Virusgehalt der Perfusatproben einzelner Perfusionen zum Zeitpunkt t log $KID_{50}/ml_P(t)$			
	1	2	3	
5	8,35	7,725	7,725	31,09 ± 18,27
20	8,35	8,1	7,975	43,34 ± 10,08
35	8,35	8,35	7,975	51,54 ± 6,63
50	8,225	8,225	8,1	46,85 ± 6,63

$$p(t) = \frac{KID_{50}/ml_P(t)}{KID_{50}/ml_A} \cdot 100\%$$

+ = Mittelwert aus n Perfusionen

s = Standardabweichung

Tabelle 15: Einzelwerte zum Clearanceverlauf bei Perfusionen mit Säuger-Reovirus, Serotyp 1 (kv-Haltung)

Zeitpunkt der Probenentnahme t (min)	Lfd. Perfusions-Nr.						p(t) ± s (%)+ (n = 6)
	Reisolierter Virusgehalt der Perfusatproben einzelner Perfusionen zum Zeitpunkt t log $KID_{50}/ml_P(t)$						
	1	2	3	4	5	6	
5	7,225	6,35	7,35	7,35	6,35	6,975	40,41 ± 24,13
20	7,225	6,225	7,475	7,35	6,85	6,6	37,59 ± 21,59
35	6,725	6,85	7,1	7,35	6,85	6,6	33,91 ± 17,5
50	6,725	6,1	7,1	7,35	6,6	6,725	26,67 ± 18,13

$$p(t) = \frac{KID_{50}/ml_P(t)}{KID_{50}/ml_A} \cdot 100\%$$

\+ = Mittelwert aus n Perfusionen

s = Standardabweichung

Tabelle 16: Einzelergebnisse zur Inaktivierung kulturinfektiöser Virus-einheiten bei Perfusion mit HP-1-Virus (kv-Haltung)

Perfusion lfd. Nr. (-)	Virusgehalt der Lebersuspension log KID_{50}/ml_L	Inaktivierungs-wert W_I (%)
1	7,02	48,26
2	6,30	78,50
3	6,81	68,63
4	5,0	96,54
5	6,94	73,10
6	5,5	81,63
7	7,21	28,54
8	6,94	61,77
9	6,54	70,74
10	7,22	51,33
11	7,07	53,95
12	6,55	46,08
13	7,25	24,73
14	7,14	32,14
Mittelwert $W_I = 58,28 \pm 20,56\%$		

Tabelle 17: Einzelergebnisse zur Inaktivierung kulturinfektiöser Virus-einheiten bei Perfusion mit Newcastle-Disease-Virus (kv-Haltung)

Perfusion lfd. Nr. (-)	Virusgehalt der Lebersuspension log KID_{50}/ml_L	Inaktivierungs-wert W_I (%)
1	7,212	51,95
2	6,75	49,26
Mittelwert $W_I = 50,60 \pm 1,34\%$		

Tabelle 18: Einzelergebnisse zur Inaktivierung kulturinfektiöser Virus-einheiten bei Perfusion mit aviärem Reovirus 118 (kv-Haltung)

Perfusion lfd. Nr. (-)	Virusgehalt der Lebersuspension log KID_{50}/ml_L	Inaktiverungs-wert W_I (%)
1	7,25	41,95
2	7,5	38,96
3	7,25	40,45
4	7,475	64,43
5	7,75	37,88
6	7,0	41,90
Mittelwert $W_I = 44,26 \pm 9,14\%$		

Tabelle 19: Einzelergebnisse zur Inaktivierung kulturinfektiöser Virus-einheiten bei Perfusion mit Säuger-Reovirus-1 (kv-Haltung)

Perfusion lfd. Nr. (-)	Virusgehalt der Lebersuspension log KID_{50}/ml_L	Inaktivierungs-wert W_I (%)
1	7,125	33,07
2	7,0	40,01
3	6,75	52,92
4	6,875	37,27
5	7,25	57,67
6	7,0	30,44
Mittelwert $W_I = 41,90 \pm 10,04\%$		

Tabelle 20: Einzelergebnisse zur Clearance und Inaktivierung nach Perfusion mit HP-1-Virus (kf-Haltung der Leberspender)

Versuchsgruppe	Perfusion lfd. Nr.	Virusgehalt im Ausgangsperfusat	Reisolierter Virusgehalt im Endperfusat	Reisolierter Virusgehalt in der Lebersuspension	Clearance wert	Inaktivierungswert
		log KID_{50}/ml_A	log KID_{50}/ml_E	log KID_{50}/ml_L	(%)	(%)
I	1	6,85	4,225	6,875	99,76	46,79
	2	6,725	3,6	6,785	99,92	42,55
	3	6,396	5,799	6,167	74,70	45,19
II	1	7,187	6,567	6,75	76,01	57,75
	2	6,827	6,1	6,75	81,25	39,37
	3	6,85	4,6	6,75	99,43	59,72
III	1	6,6	2,975	6,852	99,97	10,65
	2	6,618	4,118	6,785	99,68	26,23
	3	6,7	6,2	6,75	68,37	12,27
IV	1	6,85	4,6	6,75	99,43	59,72
	2	7,005	6,3	6,878	80,27	42,95
	3	6,85	4,904	6,965	98,86	33,71

7. Literaturverzeichnis

(1) AIGNER, K., H. WALTHER, J.C. TONN, M. KRAHL, A. WENZEL, G. MERKER, K. SCHWEMMLE, 1982: Die isolierte Leberperfusion mit 5-Fluor-Urazil (5-FU) beim Menschen. In Der Chirurg, 53, 571

(2) ASSIMACOPOULOS-JEANNET, F., L. ORCI, C. ROUILLER, B. JEANRENAUD, 1973: General Features of Glycogenolysis and Gluconeogenesis in the Perfused Liver of Normal Mice. In: Isolated Liver Perfusion And Its Applications, ed. by I. Bartosek, A. Guaitani, L.L. Miller, 1973, Ravens Press, New York, 219

(3) AX, W., 1981: Lymphozyten und Makrophagen in Wundheilung, Entzündung und Immunität. In: Wundheilung, ed. by P. Eckert, R. Häring, M. Naber, 1981, Bibliomed-Verlag, Melsungen, 49

(4) BAINE, W.B., M.G. KOENIG, J.S. GOODMAN, 1974: Clearance of Candida albicans from the Bloodstream of Rabbits. In Infect. Immun., 10, No. 6, 1420

(5) BARTOSEK, I., A. GUAITANI, S. GARATTINI, 1973: Prolonged Perfusion of Isolated Rat Liver. In: Isolated Liver Perfusion And Its Applications, ed. by I. Bartosek, A. Guaitani, L.L. Miller, 1973, Ravens Press, New York, 63

(6) BIRON, C.A., R.M. WELSH, 1982: Activation and Role of Natural Killer Cells in Virus Infections. In Med. Mikrobiol. Immunol., 170, 155

(7) BITTER-SUERMANN, D., 1980: Zur Physiologie, Pathophysiologie und Klinik des Komplementsystems. In S.M., 3, Heft 2, 43

(8) BLALOCK, J.E., J. GEORGIADES, H.M. JOHNSON, 1979: Immuntype Interferon-Induced Transfer of Viral Resistance. In J. Immunol. 122, No. 3, 1018

(9) BLOUIN, A., 1977: Morphometry of Liver Sinusoidal Cells. In: Kupffer Cells and Other Liver Sinusoidal Cells, ed. by E. Wisse, D.L. Knook, 1977, Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, New York, Oxford, 61

(10) BLOXAM, D.L., 1973: Condition and Performance of the Rat Liver Perfused with Krebs-Ringer-Solution, with Particular Reference to Amino Acid Metabolism. In: Isolated Liver Perfusion And Its Applications, ed. by I. Bartosek, A. Guaitani, L.L. Miller, 1973, Ravens Press, New York, 147

(11) BONIN, O., 1973: Quantitativ-virologische Methoden, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 183

(12) BONVENTRE, P., F., E. OXMAN, 1965: Phagocytosis and Intracellular Disposition of Viable Bacteria by the Isolated Perfused Rat Liver. In J. Reticuloendoth. Soc., 2, 313

(13) BRADFIELD, J.W.B., 1977: Reticulo-Endothelial Blockade: A Reassessment. In: Kupffer Cells and Other Liver Sinusoidal Cells, ed. by E. Wisse, D.L. Knook, 1977, Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, New York, Oxford, 365

(14) BRAUN, R., 1983: Prophylaxe von Verlusten bei der Ferkelerzeugung, Aufzucht und Mast durch Paramunisierung mit dem Inducer PIND-ORF unter Praxisbedingungen Vet. Med. Diss., München, 1983

(15) BREITER, N., 1983: Untersuchungen über die Wirksamkeit der Paramunitätsinducer PIND-AVI und PIND-ORF als Strahlenschutzsubstanz Vet. Med. Diss., München, 1983

(16) BRETTSCHNEIDER, L., C.G. GROTH, T.E. STARZL, 1968: Experimental and Clinical Preservation of Orthotopic Liver Homocrafts. In: Organ Perfusion and Preservation, ed. by J.C. Norman, 1968, Appleton-Century-Crofts, New York, 271

(17) BRIGELIUS, R., D. HEGNER, 1979: Paraquat-induced lipid peroxidation in isolated perfused rat liver. In Naunym Schmiedebergs Arch. Pharmacol., 308, Suppl. R51

(18) BRÖMME, H.J., W. BLECH, 1981: Charakterisierung des funktionellen Zustandes der in vitro Hb-frei perfundierten Rattenleber. In Acta biol. med. germ., 40, 1009

(19) BRUNNER, K.T., D. HUREZ, R.T. MCCLUSCEY, B. BENACERAF, 1960: Blood Clearance of P_{32}-labeled VS- and ND-Viruses by the RES in Mice. In J. Immunol., 85, 99

(20) CASALI, P., P. SISSONS, M.J. BUCHMEIER, M. OLDSTONE, 1981: In Vitro Generation of Human Cytotoxic Lymphocytes by Virus. In J. Exp. Med., 154, 840

(21) COHEN, S.A., D. SALAZAR, J.P. NOLAN, 1981: Natural Cytotoxicity of Isolated Rat Liver Cells. In J. Immunol., 129, No. 2, 495

(22) DAVIS, B.D., R. DULBECCO, H.N. EISEN, H.S. GINSBERG, W.B. WOOD (eds.), 1973 : Microbiology, 2. Auflage, Harper & Row, New York, London

(23) DALES, S., 1973: Early Events in Cell-Animal Virus Interactions. In Bact. Rev., 37, No. 2, 103

(24) DE MAEYER, E., J. DE MAEYER-GUIGNARD, 1982: Immunomodulating properties of interferons. In Phil Trans. R. Soc. Lond., B 229, 77

(25) DIESSELHOFF-DEN DULK, M.M.C., R.W. CROFTON, R. VAN FURTH, 1979: Origin and kinetics of Kupffer Cells during an acute inflammatory response. In Immunol., 37, 7

(26) DJEU, J.Y., J.A. HEINBAUGH, H.T. HOLDEN, R.B. HERBERMAN, 1979: Augmentation of Mouse Natural Killer Cell Activity by Interferon and Interferon-Inducers. In J. Immunol. 122, No. 1, 175

(27) ENGLER, H., H. KIRCHNER, 1983: Gamma-Interferon. In Dtsch. Apotheker Zeitung, 123, No. 38, 1751

(28) ENGLER, H., R. ZAWATZKY, H. KIRCHNER, D. ARMERDING, 1982: Experimental Infection of Inbred Mice with Herpes Simplex Virus, Part IV. In Arch. Virol., 74, 239

(29) ENNIS, F.A., A.S. BEARE, D. RILEY, G.C. SCHILD, A. MEAGER, QI YI-HUA, G. SCHWARZ, A.H. ROOK, 1981: Interferon Induction and Increased Natural Killer Cell Activity in Influenza Infections in Man. In The Lancet, Oct. 24, 891

(30) FITZPATRICK, F.A., D.A. STRINGFELLOW, 1980: Virus and Interferon Effects on Cellular Prostaglandin Biosynthesis. In J. Immunol., 125, No. 1, 431

(31) FRIEDMAN, R.L., R.J. MOON, 1977: Hepatic Clearance of Salmonella typhimurium in Silica-treated Mice. In Infect. Immun., 16, No. 3, 1005

(32) FUGASSA, E., G. GALLO, A. VOCI, R. ACCOMANDO, 1982: RNA polymerase activities in the isolated perfused rat liver. In Experientia, 38, 81

(33) GÖBEL, U., 1980: Das Komplementsystem - Bau, Funktion und klinische Bedeutung. In Wehrmed. Mschr., 12, 359

(34) GÖTZE, P., 1976: Variation des Lysozymgehaltes im Blut und in der Milch von gesunden und euterkranken Kühen Vet. Med. Diss., München, 1976

(35) GOODWIN, J.S., D.R. WEBB, 1980: Regulation of the Immune Response by Prostaglandins. In Clin. Immunol. Immunopath., 15, 106

(36) GROSSGEBAUER, K., H. RAETTIG, H. LANGMAACK, R. KÜCHLER, 1970: Zur unspezifischen Schutzwirkung von Aristolochiasäure und Lysozym bei bakteriellen und viralen Infektionen. In Zbl. Bakt. Parasitkd., Abt. I, Orig. 16, 401

(37) HASHEM, A., 1980: Wirkungsmechanismus von Paraquat an der isoliert perfundierten Rattenleber Vet. Med. Diss., München, 1980

(38) HAVELL, E.A., G.L. SPITALNY, 1983: Two Molecular Weight Species of Murine Gamma Interferon. In Virology, 129, 508

(39) HIRSCH, R.L., J.A. WINKELSTEIN, D.E. GRIFFIN, 1980: The Role of Complement in Viral Infections, Part III. In J. Immunol., 124, No. 5, 2507

(40) INGLOT, A.D., 1983: The Hormonal Concept of Interferon In Arch. Virol., 76, 1

(41) ISAACS, A., J. LINDENMANN, 1957: Viral interference: I. The Interferon. In Proc. Roy. Soc., B 147, 258

(42) JEUNET, F.S., R.A. GOOD, 1967: Reticuloendothelial Function in the Isolated Perfused Liver. I. Study of a Plasma Factor and the Nature of RE-Blockade. In J. Reticuloendoth. Soc., 4, 351

(43) KESSLER, M., R. SCHUBOTZ, 1968: Die O_2-Versorgung der hämoglobinfrei perfundierten Rattenleber. In: Stoffwechsel der isoliert perfundierten Leber, ed. by W. Staib, R. Scholz, 1968, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 12

(44) KESTENS, J.P., L. LAMBOTTE, 1973: Surgical Preparation of the Liver for Perfusion. In: Isolated Liver Perfusion And Its Applications, ed. by I. Bartosek, A. Guaitani, L.L. Miller, 1973, Ravens Press, New York, 53

(45) KOSZINOSWSKI, U., F. KRUSE, R. THOMSSEN, 1975: Interactions between Vaccinia Virus and Sensitized Macrophages in vitro. In Arch. Virol., 48, 335

(46) LANZER, G., 1981: Das Komplementsystem. In Lab. med., 5, 157

(47) LEIBOLD, W., G. JANOTTE, H.H. PETER, 1980: Spontaneous Cytotoxicity (SCMC) in Various Mammalian Species and Chicken: Selective Reaction Pattern and Different Mechanisms. In Scand. J. Immunol., 11, 203

(48) LEUNG, K.N., G.L. ADA, 1981: Induction of Natural Killer Cells During Murine Influenza Virus Infection. In Immunobiol., 160, 352

(49) LINKE, TH., H. HAHN, 1976: Träger der Infektabwehr: der aktivierte Makrophage. In Die gelben Hefte XVI, 122

(50) MACFARLAN, R.J., W.H. BURNS, D.O. WHITE, 1977: Two cytotoxic cells in peritoneal cavity of virus infected mice: Antibody-dependent macrophages and nonspecific killer cells. In J. Immunol., 119, No. 5, 1569

(51) MAURER, H.R., 1979: Interferone - brauchbare Antivirus- und Antikrebsmittel? In Dtsch. Apotheker Zeitung, 119, No. 14, 1611

(52) MAYR, A., P.A. BACHMANN, B. BIBRACK, G. WITTMANN, 1977: Virologische Arbeitsmethoden, Band II, 1977, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York, 591

(53) MAYR, A., 1982: Paramunität und Paramunisierung. In Zbl. Vet. Med. B, 29, 5

(54) MAYR, A., 1983: persönliche Mitteilungen

(55) MEIJER, D.K.F., K. KEULEMANS, G. MULDER, 1981: Isolated Perfused Rat Liver Technique: In Methods In Enzymology, 77, 81

(56) MEYER, H., 1979: Perfusion of Rat Liver with Serum of Germfree or Conventional Rats: Clearance Efficiency of Viable Pseudomonas aeruginosa. In Clin. and Experim. Gnotobiotics, ed. by Fliedner et al., 1979, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York, 237

(57) MEYER, H., A. MAYR, 1981: Untersuchungen über die Clearance und Phagozytose gegenüber Pseudomonas aeruginosa an isoliert perfundierten Lebern von keimfreien Ratten nach Vorbehandlung mit dem Paramunitätsinducer "PIND-AVI" In Zbl. Vet. Med. B. 28, 45

(58) MIELKE, H., 1980: Das mononukleäre Phagozytensystem und die Makrophagen der Kuhmilch. In Mh. Vet.-Med., 35, 370

(59) MILLER, L.L., 1973: History of Isolated Liver Perfusion And Some Still Unsolved Problems. In: Isolated Liver Perfusion And Its Applications, ed. by I. Bartosek, A. Guaitani, L.L. Miller, 1973, Ravens Press, New York, 1

(60) MILLER, L.L., 1973: Technique of Isolated Rat Liver Perfusion. In: Isolated Liver Perfusion And Its Applications, ed. by I. Bartosek, A. Guaitani, L.L. Miller, 1973, Ravens Press, New York, 11

(61) MILLER, L.L., E.E. GRIFFIN, 1973: Some Effects of Perfusate ph On Amino Acid And Protein Metabolism. In: Isolated Liver Perfusion and Its Applications, ed. by I. Bartosek, A. Guaitani, L.L. Miller, 1973, Ravens Press, New York, 139

(62) MIMS, C.A., 1964: Aspects of the Pathogenesis of Virus Disease. In Bacteriol. Rev., 28, 30

(63) MITZKAT, H.J., U. MEYER, 1973: Metabolic State of Isolated Perfused Rat Liver And Model-Induced Metabolism Modifications. In: Isolated Liver Perfusion And Its Applications, ed. by I. Bartosek, A. Guaitani, L.L. Miller, 1973, Ravens Press, New York, 79

(64) MOGENSEN, S.C., 1979: Role of Macrophages in Natural Resistance to Virus Infections. In Microbiolog. Rev., 43, No. 1, 1

(65) MOON, R.J., R.A. VRABLE, J.A. BROKA, 1975: In Situ Separation of Bacterial Trapping and Killing Functions of the Perfused Liver. Infect. Immun., 12, No. 2, 411

(66) MØRLAND, J., T. CHRISTOFFERSEN, J.B. OSNES, K.F. JERVELL, 1973: The Effect of Reduced Perfusate-ph on the Activities of Two Liver Enzymes. In: Isolated Liver Perfusion And Its Applications, ed. by I. Bartosek, A. Guaitani, L.L. Miller, 1973, Ravens Press, New York, 123

(67) MOTTA, P., 1977: Kupffer Cells as revealed by Scanning Electron Microscopy. In: Kupffer Cells and Other Liver Sinusoidal Cells, ed. by E. Wisse, D.L. Knook, 1977, Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, New York, Oxford, 93

(68) MÜLLER-BRUNECKER, G. 1983: Vergleich der Wirkung von viralen Paramunitätsinducern, BCG und Levamisol auf das Wachstum eines strahleninduzierten Transplantat-Osteosarkoms der Maus
Vet. Med. Diss., München, 1983

(69) MUTO, M., T. FUJITA, 1977: Phagocytic activities of the Kupffer Cell: A Scanning Electron Microscope Study. In: Kupffer Cells and Other Liver Sinusoidal Cells, ed. by E. Wisse, D.L. Knook, 1977, Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, New York, Oxford, 109

(70) NATHAN, C.F., H.W. MURRAY, M.E. WIEBE, B.Y. RUBIN, 1983: Identification of Interferon-γ as the Lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity. In J. Exp. Med., 158, 670

(71) NEIGHBOUR, P.A., B.R. BLOOM, 1980: Natural Resistance to Virus Infections. In: Infectious Disease, ed. by L. Weinstein, 1980, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 272

(72) OBEXER, G., H. RUMPOLD, D. KRAFT, 1983: Target-Effector-Cell Interactions in the Human Natural-Killer(NK)-System: Isolation of Target Structures. In Immunbiol., 165, 121

(73) OEHLER, J.R., R.B. HERBERMANN, 1978: Natural Cell Mediated Cytotoxicity in Rats, Part III. In Int. J. Cancer, 21, 221

(74) OPFERKUCH, W., 1977: Die klinische Bedeutung des Komplementsystems. In Immunität und Infektion, 5, No.1, 5

(75) PILLEMER, L., L. BLUM, I.H. LEPOW, L. WURZ, E.W. TODD, 1956: Properdin System and Immunity. In J. Exp. Med., 103, 1

(76) REERINK, E., 1973: Amino Acids As Ammonia Donors In The Perfused Rat Liver. In: Isolated Liver Perfusion And Its Applications, ed. by I. Bartosek, A. Guaitani, L. L. Miller, 1973, Ravens Press, New York, 155

(77) RICHTER, R., 1983: Untersuchungen zur Steigerung der Immunantwort durch den Paramunitätsinducer PIND ORF bei Geflügel
Vet. Med. Diss., München, 1983

(78) ROCKLIN, R.E., K. BENDTZEN, D. GREINDER, 1980: Mediators of Immunity: Lymphokines and Monokines. In Advances in Immunol., 29, 55

(79) RODDA, S.J., D.O. WHITE, 1976: Cytotoxic macrophages: a rapid nonspecific response to viral infection. In J. Immunol., 117, No. 6, 2067

(80) ROLLE, M., A. MAYR, 1978: Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre, 4. Auflage, Enke Verlag, Stuttgart

(81) ROOS, B., 1970: Makrophagen: Herkunft, Entwicklung und Funktion. In: Handbuch d. allg. Pathologie, VII, 3, ed. by H.W. Altmann, F. Büchner, H. Cottier, E. Grundmann, G. Holle, W. Masshoff, H. Meessen, F. Roulet, G. Seifert, G. Siebert, A. Studer, 1970, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York

(82) ROOS, E., K.P. DINGEMANS, 1977: Phagocytosis of Tumor Cells By Kupffer Cells In Vivo And In The Perfused Mouse Liver. In: Kupffer Cells and Other Liver Sinusoidal Cells, ed. by E. Wisse, D.L. Knook, 1977, Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, New York, Oxford, 183

(83) RUGGIERO, G., A. ANDREANA, A. NINNI, G. CURCI, R. UTILI, G. GIUSTI, 1977: Clearance of Viable Calmette Guérin Bacillus by the In Vitro Isolated and Perfused Rat Liver. In Acta Hepato-Gastroenterolog., 24, 102

(84) RUGGIERO, G., R. UTILI, A. ANDREANA: Clearance of Viable Salmonella Strains by the Isolated Perfused Rat Liver: a Study of Serum and Cellular Factors Involved and of the Effect of Treatment with Carbon Tetrachloride or Salmonella enteritidis Lipopolysaccharide. In J. Reticuloendothel. Soc., 21, No. 2, 79

(85) SATODATE, R., S. SASON, K. OIKAWA, N. HATAKEYAMA, S. KATSWA, 1977: Scanning Electron Microscopical Studies on the Kupffer Cell in Phagocytic Activity. In: Kupffer Cells and Other Liver Sinusoidal Cells, ed. by E. Wisse, D.L. Knook, 1977, Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, New York, Oxford, 121

(86) SAWYER, R.T., R.J. MOON, E.S. BENEKE, 1976: Hepatic Clearance of Candida albicans in Rats, In: Infect. Immun., 14, No. 6, 1348

(87) SCHMATZ, S., 1975: Virusinduzierte Antagonisten des Interferons. In Zbl. Bakt. Hyg., Abt. I, Ref. Bd. 246, 465

(88) SCHWOCHO, L.R., R.J. MOON, 1981: Clearance and killing of Candida albicans in the perfused mouse liver. In Mycopathologia, 76, 175

(89) SCHORLEMMER, H.-U., 1982: Das Komplement-System. In Die gelben Hefte, XXII, Heft 2, 49

(90) SHARMA, J.M., 1981: Natural Killer Cell Activity in Chicken Exposed to Marek's Disease Virus: Inhibition of Activity in Susceptible Chickens and Enhancement of Activity in Resistant and Vaccinated Chickens. In Avian Diseases, 25, No. 4, 882

(91) SIECK, R., B. ROTH, W. VAHS, 1977: Kinetics of Rat RES by Intravenously Injected Zymosan. In Kupffer Cells and Other Liver Sinusoidal Cells, ed. by E. Wisse, D.L. Knook, 1977: Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, New York, Oxford, 407

(92) Silvenstein, S.C., 1975: The Role of Mononuclear Phagocytes in Viral Immunity. In: Macrophages in Immunity Infection and Pathology, ed. by R. Van Furth, 1975, Blackwell Scientific Publications, Oxford, London, Edinburgh, Melbourne, 557

(93) SILZ, S., G. RUTHENSTROTH-BAUER, 1981: Stimulation of Nuclear DNA Synthesis in Perfused Rat Liver by a Specific Hepatopoëitic Factor. In Hormone and Metabolic Research, 13, No. 10, 584

(94) ŠLJIVIĆ, V. S., G. W. WARR, J.M. BARRETT, 1977: Stimulation of Hepatic Phagocytosis and the Antibody Response. In: Kupffer Cells and Other Liver Sinusoidal Cells Elsevier Biomedical Press Amsterdam, New York, Oxford, 447

(95) SOTTNEK, H.M., W.G. CAMPELL, W.A. CASSEL, 1975: The Pathogenesis of Vaccinia Virus Toxicity. II. An Electron Microscopic Study. In Laboratory Investigation, 33, No. 5, 522

(96) STENSON, W.F., CH. W. PARKER, 1980: Prostaglandins, Macrophages and Immunity. In J. Immunol., 125, No. 1,1

(97) STOSSEL, T.P., 1974: Phagocytosis, Part I (717), Part II (774). In New Engl. J. Med., 28

(98) TAGUCHI, F., A. YAMADA, K. FUJIWARA, 1980: Resistance To Highly Virulent Mouse Hepatitis Virus Acquired by Mice after Low-Virulence Infection: Enhanced Antiviral Activity of Macrophages. In Infect. Immun., 29, No. 1,42

(99) UHLENBRUCK, G., A. VAN MIL, K. DREESBACH, O. KOCH, 1982: Makrophagen und Phagozytose-Funktionsteste. In Infect. Immun., 10, 122

(100) VALBRACHT, A., J. TRENNER, B. FLEMING, K.-E. JOESTER, D. NIETHAMER, 1981: Interferon-neutralizing antibodies in a patient treated with human fibroblast interferon. In Nature, 289, 496

(101) VAN FURTH, R. (ed)., 1970: Mononuclear phagocytes. Blackwell Sci. Publ., Oxford, Edinburgh

(102) WELSH, R.M., L.A. HALLENBECK, 1980: Fffect of Virus Infections on Target Cell Susceptibility to NKcell-mediated Lysis. In J. Immunol., 124, No. 5, 2491

(103) WELSH, R.M., R.M. ZINKERNAGEL, 1977: Heterospecific cytotoxic cell activity induced during the first three days of acute lymphocytic choriomeningitis virus infection of mice. In Nature, 268, 646

(104) WELSH, R.M., R.M. ZINKERNAGEL, H.A. HALLENBECK, 1979: Cytotoxic Cells Induced During Lymphocytic Choriomeningitis Virus Infection of Mice. In J. Immunol., 122, No. 2, 475

(105) WISSE, E., 1977: Ultrastructure and Function of Kupffer Cells and Other Sinusoidal Cells in the Liver. In: Kupffer Cells and Other Liver Sinusoidal Cells, ed. by E. Wisse, D.L. Knook, 1977, Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, New York, Oxford, 33

(106) WORLD HEALTH ORGANIZATION (ed.), 1982: Interferon Therapy. In Who-Technical Report, Series 676, 1

(107) ZIMMERMANN, G., C. TENNYSON, O. BOECKL, T. DRAPANAS, 1973: Isolated Liver Perfusion Following Long-Term Freezing and Storage. Studies of Metabolic Activity and Function. In: Isolated Liver Perfusion And Its Applications, ed. by I. Bartosek, A. Guaitani, L.L. Miller, 1973, Ravens Press, New York, 87

(108) ZÖLLER, M., S. MATZKU, 1983: Rat Natural Killer (NK) Cells are not Bone Marrow Dependent. In Immunbiol., 165, 121

Herrn Prof. Dr. DDr. h.c. A. Mayr danke ich an dieser Stelle für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die Überlassung des Themas sowie für die wertvollen Hinweise bei der Durchsicht der Arbeit.

Bei Herrn Dr. R. Brunner bedanke ich mich für die jederzeit gewährte Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit und für das angenehme Arbeitsklima in seinem Labor.

Für die Assistenz bei den Perfusionsversuchen und bei der Arbeit im Labor danke ich herzlichst Frl. I. Neubauer.

Außerdem bedanke ich mich bei Fr. U. Wolf für die Unterstützung bei den elektronenoptischen Untersuchungen und für die Ausführung der photographischen Arbeiten.

LEBENSLAUF

Am 30.03.1957 wurde ich als zweite Tochter des Tierarztes Dr. Wolf-Dieter Müller und seiner Ehefrau Elfriede Müller, geb. Ott., in Nürnberg geboren.

Von 1963 an besuchte ich die Volksschule in Weiden/Opf. und wechselte 1967 an das Elly-Heuss-Gymnasium in Weiden über, an dem ich im Mai 1976 die Reifeprüfung ablegte.

Im Wintersemester 1976/77 begann ich das Studium der Tiermedizin an der Luwig-Maximilians-Universität München.

Am 03.09.1981 verehelichte ich mich mit dem Akademischen Rat Dipl.-Ing. Willi Ertl.

Im Dezember 1981 bestand ich die Tierärztliche Prüfung und erhielt am 27.01.1982 die Approbation als Tierarzt.

Seit dem Frühjahr 1982 arbeite ich als Doktorand und wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenmedizin der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München.